

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

PRÉSENCE DE TROIS PHASES DE L'ANTIGÈNE FLAGELLAIRE CHEZ DES BACTÉRIES DU GROUPE *SALMONELLA*

par L. LE MINOR et P. R. EDWARDS (*).

(Institut Pasteur, Paris, et Communicable Disease Center, Public Health Service, U. S. Department of Health, Education and Welfare, Atlanta, Georgia).

Les variations dans les antigènes flagellaires des *Salmonella* et des *Arizona* ont fait l'objet de nombreuses études depuis qu'en 1922, Andrewes [1] décrivit les phases spécifiques et non spécifiques de ces antigènes. Mais jusqu'à ces derniers temps on connaissait seulement l'existence de deux phases naturelles au maximum chez les *Enterobacteriaceae*. Or dernièrement, nous avons eu l'occasion de signaler la présence de trois phases dans l'antigène H de certaines *Arizona* [2].

Nous rapporterons ici l'existence de variations analogues dans l'antigène H des *Salmonella*. Nous avons rencontré deux souches du groupe E₂ présentant cette variation. La première (621/60) a

(*) Manuscrit reçu le 30 mai 1960.

été isolée de ganglions de porc. La seconde (1838/57) provient de jeunes dindons. Ces deux souches se sont comportées de façon semblable. Les caractères sont typiques du groupe *Salmonella* : bacilles Gram négatifs, mobiles, ne possédant ni uréase, ni désaminase, ne produisant pas d'indole ni d'acétylméthylcarbinol, ne faisant pas fermenter : adonitol, sorbose, lactose, saccharose et salicine ; xylose, arabinose, rhamnose, glucose, mannitol, sorbitol, dulcitol, maltose, tréhalose, inositol, D-tartrate de sodium sont fermentés en un jour avec production de gaz en glucose. Ces souches réduisent les nitrates en nitrites, cultivent sur milieu de Simmons au citrate de sodium, produisent en abondance de l' H_2S , font virer au violet de milieu de Stern au glycérol. La réaction au rouge de méthyle est positive en milieu de Clark et Lubs. Ces *Salmonella* possèdent une lysine-décarboxylase et ne protéolysent pas la gélatine.

Nous rapporterons d'abord les caractères obtenus avec la souche 621/60 (porc). La culture de départ était agglutinée sur lames par les sérums anti-O : 3,15 et 15 saturé, et par le sérum z_{27} . Un isolement sur boîtes de Petri montra, lors de l'examen en transillumination oblique, une légère différence entre les colonies : certaines étaient plus irisées que d'autres. Nous avons par prudence étudié une colonie de chaque type et ensemencé des géloses molles additionnées de sérum z_{27} . Avec un type de colonies nous avons trouvé une agglutination dans le sérum 1,2, avec l'autre dans le sérum eh. Etonnés de ce résultat, nous sommes repartis d'une colonie de chaque type obtenue après trois réisolements successifs. Les résultats ont été semblables avec les deux types de colonies : la culture était agglutinée par les sérums 3,15, 15 et z_{27} ; par repiquage en gélose additionnée de sérum z_{27} , nous avons obtenu une agglutination dans les sérums 1,2 et 2 pur, par culture en présence des sérums z_{27} et 1,2, une agglutination dans le sérum eh et par culture en présence des sérums eh + z_{27} une agglutination dans le sérum 1,2.

Les variations obtenues sont schématisées dans la figure 1 qui résume une des expériences faites avec cette souche.

A partir de la phase z_{27} , nous n'avons eu aucune difficulté à obtenir les phases eh et 1,2. De même à partir de la phase eh il a été facile d'obtenir la phase 1,2, dans un cas (c), la phase z_{27} . Dans d'autres cas, au contraire (a, b), nous n'avons pu, malgré 8 passages (b) et 4 passages (a) sur un tube en U additionné de sérums eh et 1,2, obtenir la phase z_{27} à partir de eh ou de 1,2.

Dans une autre série d'expériences, faites à partir d'une autre colonie isolée, nous avons obtenu rapidement les phases eh et 1,2 à partir de z_{27} , les phases z_{27} et 1,2 à partir de eh, la phase eh

à partir de 1,2. Il fallut au contraire 6 passages sur gélose molle + sérum eh + 1,2 pour obtenir la phase z_{27} à partir de 1,2.

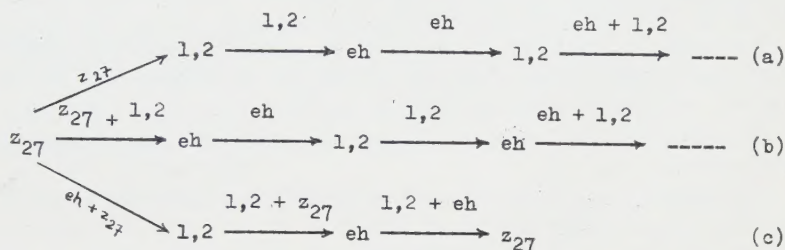


FIG. 1. — Au-dessus des flèches sont indiqués les sérums ajoutés au milieu de culture.

Notons enfin que chaque fois que nous avons cultivé la souche en présence des sérums eh + 1,2 + z_{27} , elle fut immobilisée.

Les épreuves d'agglutination en tubes et de saturation ont donné les résultats suivants :

Une suspension 0 de la souche est agglutinée à 1/1 600 (titre homologue) par le sérum anti-*S. newington* et la saturation en enlève toutes les agglutinines. Il en est de même pour la phase 1,2 agglutinée à 1/25 600 (titre homologue) par le sérum anti-*S. typhi murium* phase 2. La phase eh est agglutinée à 1/19 200 par le sérum anti-*S. anatum* phase 1 (titre homologue 1/25 600). Après saturation *S. anatum* phase 1 est encore agglutinée à 1/200.

La phase z_{27} est agglutinée à 1/12 800 (titre homologue) par le sérum anti-*S. simsbury*. Après saturation, cette souche y est encore agglutinée à 1/800.

L'existence de trois phases dans la souche 1838/57 fut aussi découverte par hasard. Au cours d'essais de transformation de *S. simsbury* en *S. senftenberg*, l'un de nous (P. E.) fut amené à inclure *S. hamilton* (3,15 : z_{27}) dans l'expérience. Mis en présence de sérum z_{27} , l'antigène H de cette culture ne fut pas changé en gst, comme on le présumait, mais en 1,2. Une colonie isolée de la phase 1,2 placée dans le sérum homologue donna une agglutination dans eh. Ce changement de phase inhabituel fut alors étudié de plus près.

Une colonie isolée de la souche de départ (phase z_{27}) fut cultivée en présence de sérum z_{27} et isolée. Dix colonies furent examinées : 8 étaient agglutinées par le sérum eh, 2 par le sérum 1,2. Ces 10 colonies, après trois cultures en présence de sérums $z_{27} + 1,2 + h$ ne furent pas agglutinables par d'autres sérums, ce qui,

comme pour la souche précédente, laisse présumer qu'il n'existe pas de quatrième phase.

Certains changements de phase se font très facilement, d'autres semblent très difficiles à obtenir.

La phase z_{27} cultivée en présence de sérum z_{27} devient immédiatement agglutinable dans eh. Il en fut de même lors de la culture en présence de sérums $z_{27} + 1,2$.

En présence de sérums $h + z_{27}$, elle devient immédiatement agglutinable par 1,2.

La phase 1,2 après deux passages en présence de sérum anti-1,2, devient agglutinable par z_{27} .

Les phases eh et 1,2 de 1838/57 sont interchangeable à volonté. De même, on peut obtenir facilement eh et 1,2 à partir de la phase z_{27} suivant le sérum utilisé. Ces changements se produisent sans difficulté et toujours immédiatement quand les bactéries sont placées en tubes de gélose molle additionnée de sérum.

L'isolement de la phase z_{27} à partir des phases 1,2 et eh semble difficile à obtenir. De nombreuses colonies ont été repiquées et transférées en série en présence des sérums $h + 1,2$. Seulement deux fois, nous avons pu obtenir z_{27} à partir de la phase 1,2. Nous avons toujours échoué à l'isoler à partir de eh.

La phase gst n'a jamais été isolée à partir de 3,15 : z_{27} , comme on peut le faire à partir de 1, 3, 19 : z_{27} . Ceci peut être dû au fait que ces deux antigènes z_{27} ne sont pas strictement identiques.

Ces deux souches qui ont des caractères biochimiques semblables, sont certainement identiques. Nous avons recherché si elles étaient lysogènes en faisant agir le filtrat de cultures de cinq heures en bouillon, irradiées aux ultra-violets, sur 67 séro-types différents de *Salmonella*. Les deux filtrats se comportèrent de façon identique et provoquèrent la formation de plages sur *S. abortus equi*, *S. bredeney*, *S. sendai*, *S. gallinarum*, *S. rostock*, *S. napolii*, *S. dublin*, *S. zanzibar*, *S. uganda*, *S. kimhasa*. Notons que ces bactériophages furent inactifs sur plusieurs souches de *S. miami*, alors qu'ils sont actifs sur *S. sendai*. Nous l'avons ensuite fait agir sur 36 souches de *S. gallinarum* et sur 20 souches de *S. typhi* dont 3 souches W immobiles, des souches V, Ty 6S et R_2 . De nombreuses plages se produisirent sur toutes les *S. gallinarum* à l'exception de 2 souches R, alors que tous les *S. typhi* furent insensibles à ce bactériophage. Peut-être pourrait-il être utile dans la différenciation des *S. gallinarum* et des *S. typhi* W immobiles.

Nous avons aussi fait des essais de transduction des antigènes flagellaires de nos souches sur *S. gallinarum* et *S. abortus equi*. Jusqu'à présent nous avons échoué.

DISCUSSION.

Chez ces deux *Salmonella*, les taux de mutation [3] des phases $eh \longleftrightarrow 1, 2, z_{27} \longrightarrow eh$ et $z_{27} \longrightarrow 1, 2$ sont ceux habituellement rencontrés chez les *Salmonella* diphasiques, et il est facile de passer de l'une à l'autre dans le sens indiqué par les flèches. Au contraire, ceux des phases $eh \longrightarrow z_{27}$ et $1, 2 \longrightarrow z_{27}$ semblent nettement inférieurs et il est souvent nécessaire de faire de nombreux passages en présence des sérums correspondants pour obtenir des changements.

Au point de vue nomenclature, on pourrait considérer ces souches comme des *S. hamilton* [4] triphasiques, la formule de *S. hamilton* étant $3, 15 : z_{27}$. Comme *S. hamilton*, nos souches ne saturent pas complètement le sérum anti-*S. simsbury*. Mais *S. hamilton* a été retirée du schéma de Kauffmann-White. Ces souches pourraient donc être considérées comme des *S. goerlitz* ($3, 15 : eh : 1, 2$) ayant une troisième phase z_{27} [5]. *S. goerlitz* présente d'autre part les mêmes caractères biochimiques que *S. hamilton* et que nos deux souches.

RÉSUMÉ.

Description de deux souches de *Salmonella* qui présentent trois phases de l'antigène flagellaire. Chacune de ces trois phases se rencontre normalement chez divers sérotypes mono- ou diphasiques. Bien que les taux de mutation semblent différents selon les réversions désirées, celles-ci peuvent être sélectionnées par les sérums rajoutés dans le milieu de culture. La formule de ces *Salmonella* est $3, 15 : z_{27} : eh : 1, 2$.

SUMMARY

EXISTENCE OF THREE PHASES OF THE FLAGELLAR ANTIGEN
IN BACTERIA OF THE *Salmonella* GROUP.

Description of two *Salmonella* cultures having the antigenic formula $3, 15 : z_{27} : e, h : 1, 2$. One culture was isolated from the lymph node of a hog, the other from a diseased poult.

Both cultures behaved as $3, 15 : z_{27}$, but by cultivation in semi-solid agar containing z_{27} serum it was possible to isolate $3, 15 : e, h$ and $3, 15 : 1, 2$ forms which were spontaneously reversible each to the other one. From the $3, 15 : 1, 2$ form it was possible again to obtain $3, 15 : z_{27}$ form, but this change occurred only exceptionally and with difficulty. This is the first instance in which three naturally occurring flagellar phases have been recognized in a *Salmonella* culture.

★★

Nous remercions M^{lle} Ch. Charié-Marsaines de sa collaboration technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDREWES (F. W.). *J. Path. Bact.*, 1922, **25**, 505.
 - [2] EDWARDS (P. R.), FIFE (M. A.), et LE MINOR (L.). *J. Bact.*, 1960 (sous presse).
 - [3] STOCKER (B. A. D.). *J. Hyg.*, 1949, **47**, 398.
 - [4] MORAN (A. B.) et EDWARDS (P. R.). *Cornell Veter.*, 1958, **48**, 186.
 - [5] KAUFFMANN (F.). (Communication personnelle, 21 mars 1960.)
-

**MILIEUX ET MODALITÉS DE CULTURE ADAPTÉS A LA
RÉANIMATION ET A LA MULTIPLICATION IN VITRO
DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS
DE VITALITÉ RÉDUITE, DE VIABILITÉ ÉPHÉMÈRE,
OU EN ÉTAT DE QUIESCENCE**

par P. J. COLETSOS (*)

(avec la collaboration technique de M^{lles} E. ORIoT et N. de REGEL).

(*Institut Pasteur, Service de la Tuberculose* [D^r J. BRETEY])

La hiérarchie des valeurs dans l'isolement et l'identification de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. t.*) par ordre de sensibilité croissante s'établissait comme suit :

- a) Examens microscopiques ;
- b) Culture sur milieux favorables ;
- c) Inoculation aux animaux de laboratoire, le cobaye en particulier.

Depuis l'avènement des antibacillaires nous assistons progressivement à l'inversion de la règle précédente.

1° Dans nombre de cas, la sensibilité du cobaye se situe en deçà de celle de la culture. Cette éventualité est très fréquente comme on le sait avec les bacilles INH-résistants.

2° Dans d'autres cas, dont le nombre augmente chaque année, alors que les simples examens microscopiques mettent en évidence des bacilles et parfois en nombre considérable, il n'est pas rare de voir échouer totalement la culture et l'inoculation au cobaye.

Ces échecs avec des bacilles morphologiquement intacts à l'examen microscopique paraissent peu conformes et en désaccord avec les données cliniques et épidémiologiques.

Sur le plan clinique, la persistance de lésions anatomo-radio-logiques actives étant la règle, le rôle pathogène de ces bacilles pour l'homme qui les héberge et les élimine ne fait aucun doute.

(*) Manuscrit reçu le 31 mai 1960.

Sur le plan épidémiologique, certaines observations sont troublantes :

1° Alors que la plupart des agents contaminateurs répandent des bacilles mono- ou poly-résistants, il est exceptionnel que les souches isolées à partir des sujets récemment atteints et non encore traités, soient d'emblée résistantes.

2° Bien que les tuberculeux chroniques éliminent en majorité des bacilles INH-résistants, donc avirulents, leur entourage est exposé à des risques de contamination certains.

3° Enfin statistiquement, malgré la diminution de la mortalité par tuberculose dans des proportions considérables, la morbidité tuberculeuse reste encore élevée [1].

Toutes ces questions restent encore en suspens et l'acceptation de la part des biologistes de l'éventualité de bacilles dits « visibles et non viables » rend plus malaisée encore l'explication et l'interprétation des faits.

Ces problèmes d'ordre biologique, clinique et épidémiologique, distincts en apparence mais directement dépendants du bacille, semblent cependant devoir être rattachés :

1° A l'hétérogénéité fondamentale des populations bacillaires ;

2° Aux modifications biologiques (métaboliques, enzymatiques, etc.) imprimées aux bacilles par l'emploi systématique des antibiotiques ;

3° A la régression de la vitalité et de la virulence de la plupart des souches de *M. t.*, régression qui ne doit pas être attribuée exclusivement et intégralement aux antibacillaires mais également à toutes les mesures faisant partie de la lutte antituberculeuse.

Ces notions transposées strictement sur le plan de la culture du *M. t.*, *in vitro*, soulèvent et justifient un certain nombre de questions :

1° Comment pourrions-nous prétendre assurer *in vitro* les conditions physiologiques idéales, les besoins en sels et catalyseurs minéraux, en vitamines et substances organiques indispensables à tous et à chacun des éléments qui composent une population bacillaire ?

2° Les besoins vitaux seraient-ils les mêmes pour les bacilles spontanément expulsés de l'organisme (expectoration, urine, ganglion fistulisé) et ceux prélevés de force par ponction, biopsie ou ablation chirurgicale ?

Est-ce rationnel d'envisager des conditions de vie identiques :

a) Pour les bacilles vivant dans le poumon en libre communication avec les bronches, et ceux emprisonnés dans des foyers enkystés ?

b) Pour les bacilles en phase de multiplication active et ceux en « état de quiescence » ?

3° Enfin, comment pourrions-nous suppléer efficacement aux carences multiples et complexes des bacilles ayant été exposés à des degrés divers et pendant une durée variable aux effets néfastes de la chimiothérapie ?

Si, comme nous le devons, nous prenons en considération ces différents facteurs, les échecs de culture étant là pour nous le rappeler, force nous est d'admettre que le milieu de culture unique et polyvalent ne saurait être ni simple, ni facile à réaliser.

En outre, le bactériologiste à la recherche d'une réponse satisfaisante aux questions posées ci-dessus doit s'appliquer :

1° A assurer la pérennité des bacilles qui transférés *in vitro* se révèlent d'une *vitalité réduite* et d'une *viabilité éphémère*. Exemple : ces micro-colonies qui avortent sur place ou qui parviennent péniblement — après une incubation prolongée — au stade macroscopique, et qui se montrent peu viables puisque non repiquables.

2° A réanimer les bacilles qui persistent et vivent au ralenti au sein de l'organisme : bacilles en *état de quiescence* [2, 3] responsables de rechutes, également peu ou pas viables *in vitro*.

3° A faire vivre hors de l'organisme des bacilles morphologiquement intacts, mais perturbés dans leur métabolisme et dans leurs aptitudes à la biosynthèse au point d'être dans l'incapacité d'utiliser les éléments nutritifs présents dans nos milieux de culture.

A cet égard, l'hypothèse d'après laquelle ces bacilles trouveraient dans l'organisme humain des substances dont il est difficile de préciser la nature, paraît actuellement fondée.

Aussi, avant de passer en revue les moyens susceptibles de remédier à ces difficultés, avons-nous essayé d'analyser et d'étudier deux grands ordres de facteurs :

1° Facteurs extrinsèques [4] ;

2° Facteurs intrinsèques [5] de *M. t.*, responsables d'échecs de culture sur milieux usuels.

Parallèlement, nous avons tenté d'expliquer le mécanisme d'entrée en quiescence de *M. t.*, et nous avons démontré expérimentalement la possibilité de réanimer ces bacilles *in vitro* [3, 5].

De l'ensemble de nos recherches ressortent :

a) Le rôle néfaste des facteurs extrinsèques ;

b) L'importance des facteurs intrinsèques ;

c) La nécessité de ne pas perdre de vue la fragilité et la vulnérabilité actuelles de *M. t.* à l'égard des agents physiques, chimiques et médicamenteux.

La prise en considération de ces notions nous paraît indispensable pour circonscrire et ramener à ses justes proportions le problème des bacilles dits « visibles et non viables ».

PHÉNOMÈNE « D'INTERSTIMULATION ».

Une des particularités des bacilles de vitalité et de viabilité réduites est le phénomène d'« interstimulation ».

Nous entendons par ce terme *le renforcement mutuel de la vitalité des bacilles disposés en groupe par rapport à leurs diffcultés de survie à l'état d'unités dispersées.*

Avec des bacilles de vitalité normale, lorsqu'on procède à des « dilutions » progressives, en réalité à des dispersions de plus en plus poussées, le nombre de colonies décroît de façon régulière, avec avantage pour la « dilution » qui suit par rapport à celle qui la précède. Exemple : pour 500 colonies à 10^{-4} mg nous aurons souvent 60 à 80 colonies à 10^{-5} et 8 à 12 colonies à 10^{-6} mg.

Cela tient au fait que les groupements de 3 à 10 bacilles donnent naissance chacun à une colonie, de même que les unités isolées ou les groupements par 2 ou 3 bacilles aboutissent au même résultat.

L'addition d'un dispersant (Tween 80) dans les suspensions bacillaires imprime une allure plus régulière à la courbe décroissante ; il persiste cependant un léger avantage pour les « dilutions » intermédiaires, avantage qui disparaît dans les « dilutions » très poussées où le hasard dans la répartition des unités est imprévisible.

Pour les bacilles de vitalité diminuée et dans des conditions d'ensemencement identiques, il se produit le phénomène inverse. Exemple : passant d'une suspension bacillaire qui donne naissance à 50 colonies par tube, à la dispersion suivante au 1/10, le succès de la culture est aléatoire ou nul, contre une culture constamment positive pour une souche de vitalité normale.

Si, par surcroît, on fait coïncider la dispersion avec la transplantation (changement de milieu), le phénomène devient encore plus remarquable et le repiquage est toujours négatif à moins de faire appel à de fortes concentrations bacillaires.

L'« interstimulation » ou « effet de groupe » se manifeste également et dans certaines circonstances chez les bacilles de vitalité normale. Exemple : le succès de la culture en voile sur milieu synthétique de Sauton, qui exige un état de contiguïté intime entre les différentes parties de la semence. Il suffit en effet de disperser la semence à la surface du milieu ou d'empêcher la contiguïté

par de très faibles vibrations pour faire échouer complètement la culture en voile.

L'« interstimulation » ou « effet de groupe » interviendrait également *in vivo*, par exemple dans le déclenchement de tuberculoses expérimentales chez les animaux de laboratoire peu réceptifs (rats, souris), chez lesquels les inocula pauvres en bacilles restent sans effet.

N'y a-t-il pas lieu d'établir une relation entre ces circonstances biologiques et les cas de primo-infections survenant dans l'entourage immédiat de malades éliminant des bacilles réputés avirulents ou non viables ?

Par conséquent, lors de la transplantation des bacilles de leur milieu de vie habituel à un milieu très différent et moins favorable (c'est toujours le cas pour la primo-culture), l'« effet de groupe » peut être utile aux bacilles de vitalité normale et absolument indispensable aux bacilles de vitalité réduite, car ils s'épaulent et se renforcent mutuellement.

Dans cet ordre d'idées et dans le but d'améliorer les chances de succès de la primo-culture, nous avons tenté d'éprouver le rôle de l'apport extemporané à l'ensemencement de corps bacillaires morts ou vivants.

Pour cela nous avons fait appel : soit à des bacilles morts, de type humain ou bovin, ou de type *M. phlei*, tués par tyndallisation ou par rayonnement U. V. et déchargés de tuberculine (facteur défavorable à la culture *in vitro*), soit à des bacilles vivants ne cultivant pas à 38° C (type *M. balnei*).

La modicité des résultats obtenus dans les deux cas pourrait être attribuée à la destruction des enzymes lors de la tyndallisation et aux différences enzymatiques entre *M. balnei* et *M. t.*

Conclusion pratique pour la primo-culture : éviter autant que faire se peut la dispersion des bacilles présents dans un produit pathologique chaque fois que l'on est en droit de douter de la vitalité et de la viabilité des bacilles qui y sont contenus.

CHOIX DU MILIEU FAVORABLE A LA PRIMO-CULTURE DE *M. tuberculosis*.

Sur le plan purement scientifique on ne saurait se déclarer satisfait que par la réalisation du ou des milieux synthétiques capables d'assurer *in vitro* la culture des bacilles dits normaux et de ceux dits « visibles et non viables ».

En attendant cette réalisation par des recherches conjuguées des biochimistes et des bactériologistes, deux types de milieux paraissent répondre actuellement au mieux des exigences de la primo-culture de *M. t.*

1° LES MILIEUX SEMI-SYNTHÉTIQUES. — Ceux de Dubos [6, 7, 8] et de Youmans [9], à l'état liquide assurent à *M. t.* une multiplication accélérée. Il était donc normal que des milieux de ce type, solidifiés par addition de gélose, soient utilisés pour la primoculture de *M. t.* [10, 11]. Leur emploi se trouve cependant limité du fait :

a) Des contaminations fréquentes : malheureusement l'addition de pénicilline pour les protéger se révèle préjudiciable au développement des bacilles de vitalité et de viabilité réduites ; il en est de même avec le vert malachite lorsqu'il est incorporé à un taux supérieur à $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ alors qu'en milieu à l'œuf le taux de $200 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ (dix fois plus élevé) n'a pas les mêmes inconvénients ;

b) De leur moindre sensibilité comparée à celle des milieux à l'œuf, le milieu de Jensen en particulier, pour l'isolement de *M. t.* à partir des produits pathologiques [12, 13, 14] ;

c) Des difficultés d'appréciation morphologique et d'étude individuelle des colonies.

2° LES MILIEUX SOLIDES A L'ŒUF. — Depuis celui de Dorset [15], de nombreuses préparations ont été proposées : celles de Lowenstein [16], de Herold [17], de Petraghiani [18], de l'American Trudeau Society A. T. S. [19], de Jensen [20]. De tous ces milieux, c'est incontestablement le milieu de Jensen à 0,75 p. 100 de glycérine le plus sensible.

MILIEUX ADAPTÉS A LA PRIMO-CULTURE DE *M. tuberculosis* DE VITALITÉ ET DE VIABILITÉ RÉDUITES.

Dès 1950, donc avant la découverte de l'INH, certains échecs de culture à partir des pièces d'exérèse nous incitèrent à en rechercher les causes possibles [21].

Par ailleurs, certaines contaminations, soit par des moisissures, soit par d'autres germes qui avaient la particularité d'abaisser le pH du milieu, ayant eu pour conséquence de nous assurer une culture positive pour *M. t.* alors que les tubes restés intacts demeuraient négatifs, le fait aussi que dans certains tubes positifs pour *M. t.* nous avons relevé une dépression manométrique de l'ordre de — 10, — 20 et — 30 cm d'eau alors que les tubes homologues à pression normale restaient négatifs, nous ont amené à étudier :

1° Le rôle des substances sécrétées par les germes de contamination ;

- 2° L'influence sur *M. t.* du pH du milieu pendant l'incubation ;
- 3° Le rôle de l'atmosphère appauvrie en O₂ [5, 22].

Parallèlement nous avons cherché à étudier l'influence sur la culture de *M. t.* de certains produits chimiquement bien définis, de certaines vitamines, d'acides aminés et d'une gamme de filtrats ou extraits d'origine végétale, microbienne ou animale.

Nos essais expérimentaux pendant ces dix dernières années ont porté surtout sur des populations bacillaires provenant directement de l'homme, les souches de collection étant peu démonstratives en l'occurrence.

Notre but a consisté à identifier et à sélectionner les produits ou substances favorables au développement des bacilles de vitalité et de viabilité réduites.

L'excessive lenteur de nos investigations réside dans le fait que :

a) La culture des bacilles dysgoniques au sens étymologique du terme, nécessite un délai souvent égal ou supérieur à trois mois ;

b) Les produits ou substances non préjudiciables au développement des bacilles dits normaux et favorables aux bacilles de vitalité réduite sont plutôt rares ;

c) La marge entre le seuil d'activité et le seuil de tolérance pour chacun de ces produits ou substances est très réduite. C'est le cas pour le Mn, les vitamines et nombre d'acides aminés [23].

Aussi on ne s'étonnera pas que de préférence aux vitamines et acides aminés, aux effets inconstants et souvent contradictoires, nous ayons fait appel aux oligo-éléments dont le rôle comme catalyseurs susceptibles d'amorcer la biosynthèse *in vitro* s'est révélé beaucoup plus intéressant.

Le pyruvate et le glutamate de sodium ainsi que le bleu de tournesol (lichens de Madagascar) ont retenu notre attention et entrent dans la composition du milieu de base que nous proposons à cause de leur action stimulante sur une large échelle pour *M. t.* [24].

Le rôle de l'osséine dans le milieu sera précisé plus loin.

Toujours est-il que notre milieu de base, dont la composition et le mode de préparation sont donnés dans les pages suivantes, assure le développement et la multiplication *in vitro* de la grande majorité des bacilles de vitalité normale ou faiblement réduite.

Cependant, pour certaines populations bacillaires composées en majorité de bacilles sérieusement perturbés dans leur métabolisme et leurs fonctions enzymatiques, et de ce fait incapables de biosynthétiser *in vitro*, l'apport extemporané à l'ensemencement de substances d'origine organique végétale (champignons, lichens,

giberelline), microbienne (extraits ou corps de germes banaux ou A. A. R.), ou animale (extraits d'organes) est apparu indispensable.

Or, la sélection de substances d'origine organique est encore plus délicate et plus difficile, parce que soumises à des variations, que celle de produits chimiquement bien définis.

Si, en définitive, nous avons opté pour les extraits d'organes provenant du singe, solution de luxe certes, mais imposée par

TABLEAU I. — Composition globale.

	MILIEU T.B.C. INSTITUT PASTEUR	
	Milieu de Base (Composition)	
	Pour 1 l. d'oeufs 1,600 l. de milieu terminé	Pour 100 ml. de milieu terminé
Phosphate Monopotassique	2,4 g.	0,15 g.
Sulfate de Magnésium	0,24 g.	0,015 g.
Citrate de Magnésium	0,6 g.	0,0375 g.
Asparagine G	3,6 g.	0,225 g.
Pyruvate de Sodium	1,6 g.	0,1 g.
Glutamate de Sodium	1,6 g.	0,1 g.
Bleu de Tournesol R.A.L.	0,4 g.	0,025 g.
Cendres d'Anthracite	0,16 g.	0,01 g.
Solution Oligo-Dynamique	1,6 ml.	0,1 ml.
Glycérine bidistillée	12 ml.	0,75 ml.
Fécule de P. de Terre	16 g.	1 g.
Vert Malachite à 2%	16 ml.	1 ml.
Eau distillée	440 ml.	27,5 ml.
Osséine stérile à 4% pH 6.8	160 ml.	10 ml.
Oeufs {	entiers	800 ml.
	Jaunes d'oeufs	200 ml.
		50 ml.
		12,5 ml.

les exigences toutes particulières des bacilles réputés « visibles et non viables », c'est parce que les extraits d'organes d'animaux moins précieux — lapin, cobaye, veau, etc. — se sont révélés moins efficaces.

Milieu BO (milieu de base + osséine à 20 p. 100 exsudée)

Culture « sous cape ».

Même composition que le milieu de base, seul le taux d'osséine est différent : introduire 160 ml d'osséine à 20 g p. 100, au lieu de 160 ml à 4 g p. 100 dans le milieu de base.

ÉLÉMENTS CONSTITUANTS.

Solution de sels

(Pour 1 l d'œufs soit 1 600 l de milieu terminé).

Verser dans un ballon en Pyrex :

Phosphate monopotassique	2,4 g
Sulfate de magnésium	0,24 g
Citrate de magnésium	0,6 g
Asparagine G	3,6 g
Pyruvate de sodium	1,6 g
Glutamate de sodium	1,6 g
Bleu de tournesol, lichens hydrosolubles R. A. L.	0,4 g
Glycérine bidistillée	12 ml
Eau distillée	440 ml

A dissoudre à chaud au bain-marie à ébullition (la teinte est celle du vin pelure d'oignon). Le pH est de 4,4.

Solution oligo-dynamique de A. Berthelot et G. Bertrand [25] (1).

H ₂ O	1 000 ml
SO ₄ Mn 7H ₂ O	2 g
SO ₄ Ca 2H ₂ O	0,50 g
Cl ₂ Ni 6H ₂ O	0,05 g
Cl ₂ CO 6H ₂ O	0,05 g
(SO ₄) ₂ Ti ₂	0,20 g
SO ₄ Zn 7H ₂ O	0,10 g
SO ₄ Cu 5H ₂ O	0,05 g
SO ₄ Gl 4H ₂ O	0,10 g
BO ₃ H ₃	0,05 g
SO ₄ H ₂ 66°B	1 ml

Verser dans l'eau les différents produits dans l'ordre indiqué ci-dessus et agiter chaque fois.

Remuer énergiquement après l'addition finale d'acide sulfurique (1 ml).

Attendre quinze minutes.

Filtrer sur papier.

Répartir dans des ampoules de 5 ml et les sceller à la flamme.

Autoclaver trente minutes à 110° C.

Conserver à la glacière à 4° C.

Durée de conservation : un an et davantage.

(1,6 ml pour 1 l d'œufs soit 0,1 ml pour 100 ml de milieu terminé).

Autres oligo-éléments. — Outre ceux contenus dans l'osséine, ceux contenus dans les cendres d'anthracite tamisées très fines et stérilisées au four Pasteur (0,16 g par litre d'œufs soit 0,01 g pour 100 ml de milieu terminé).

(1) La formule originale complète comporte en tête de liste du (SO₄)₃Fe₂, 50 g pour un litre, que nous avons éliminé.

Osséine à 4 p. 100 pour milieu de base
(A préparer à l'avance).

Dans un grand récipient à large ouverture verser 960 ml d'eau distillée. Chauffer au bain-marie à 100° C.

Ajouter très progressivement en agitant avec une baguette de verre plein 40 g d'osséine (gélatine brute).

Après fluidification complète, ramener le pH à 6,8 à l'aide d'une solution de soude caustique à 6 p. 100, en présence d'un indicateur.

Filter à chaud et sous vide, sur papier, dans un filtre de Buchner.

Toujours à chaud répartir l'osséine dans des ballons en Pyrex à raison de 80 et 160 ml par ballon.

Stériliser à l'autoclave trente minutes à 110° C en faisant monter l'autoclave très doucement après fluidification de l'osséine par séjour à l'étuve à 37° pendant une heure.

Après autoclave, capuchonner au caoutchouc pour éviter l'évaporation et conserver à l'obscurité.

Vérifier toujours l'aspect avant l'utilisation : teinte jaune claire limpide.

Osséine à 20 p. 100 pour milieu BO : culture sous « cape »
(Milieu de base + osséine exsudée).

Eau distillée	800 ml
Osséine (gélatine brute)	200 g
Même préparation que pour l'osséine à 4 p. 100.	

Après neutralisation à pH 6,8 et stérilisation à l'autoclave trente minutes à 110° C, répartir dans des ballons en Pyrex à raison de 80 et 160 ml par ballon.

Pulpe d'organes de singe. Foie.
(Pour la culture en « double couche ».)

Un jeune singe cynocéphale, indemne de toute affection et parasitose et n'ayant jamais servi à d'autres expériences, après anesthésie générale au chloroforme, est saigné à blanc par ponction cardiaque et section des deux carotides.

Le foie est prélevé après laparatomie effectuée avec les précautions rigoureuses d'asepsie chirurgicale.

La vésicule biliaire et les canaux hépatiques sont largement excisés et éliminés.

Le foie est immergé dans de l'eau distillée stérile tiède. Il est ensuite débité en petits morceaux et pesé.

Après rinçage à l'eau distillée stérile pour éliminer le sang laqué, les morceaux de foie sont émincés aux ciseaux et réduits en pulpe.

Ajouter trois fois son poids d'eau bidistillée stérile (300 ml d'eau pour 100 g de foie).

Filtrer sur gaze à deux épaisseurs.

Distribuer dans des ampoules teintées.

Sceller aussitôt.

Tyndalliser à l'étuve, à 54-56°.

Faire des témoins de stérilité.

Conserver à la glacière, à 4°. Délai d'utilisation : six mois. Pour les reins même processus de préparation. Pour le cerveau broyer et ajouter six fois son poids d'eau bidistillée stérile. Les extraits d'organes lyophilisés sont légèrement moins actifs que la pulpe conservée à la glacière, à 4°.

MODE DE PRÉPARATION DES MILIEUX.

I. — Dans un ballon de Pyrex d'une capacité de 3 l, contenant des billes de verre et 16 g de fécule de pomme de terre préalablement autoclavée trente minutes à 110° C, on introduit la solution de sels préparée à l'avance.

Le ballon est placé au bain-marie à ébullition et remué continuellement jusqu'à homogénéisation complète (quinze minutes environ). La température du bain-marie est ensuite abaissée à 56° et maintenue pendant une heure.

II. — Quelques minutes avant le retrait du ballon du bain-marie, ajouter dans le mélange fécule de pomme de terre-sels, 0,16 g de cendres d'anhracite tamisées fines et stériles, 1,6 ml de solution oligo-dynamique de A. Berthelot et G. Bertrand. Remuer énergiquement et laisser quelques minutes à 56° (la teinte rosée du mélange s'accroît).

III. — Des œufs frais (provenant d'un élevage surveillé) à coquille claire et à coquille foncée, sont préalablement brossés à l'eau courante et immergés pendant une heure dans de l'alcool à 90° non dénaturé et sont cassés un à un et versés dans une éprouvette graduée.

Mesurer 800 ml d'œufs entiers et 200 ml de jaunes en éliminant le blanc. Ces œufs sont battus et homogénéisés à l'aide de baguettes de verre pendant dix minutes.

IV. — Verser les œufs homogénéisés dans la solution de sels retirée du bain-marie depuis quinze minutes afin d'éviter la formation de grumeaux au contact d'une solution trop chaude (la teinte du mélange est celle de la crème au caramel).

V. — Filtrer le tout sur gaze (trois épaisseurs) avec toutes les précautions de stérilité.

Avant de passer aux étapes suivantes qui constituent les opérations terminales de la préparation du milieu, un triple choix est offert :

- a) Soit préparer la totalité en milieu de base (B) ;
- b) Soit préparer la totalité en milieu BO (base + osséine exsudée) ;
- c) Soit, ce que nous conseillons, consacrer la moitié du volume en milieu de base (B) et l'autre moitié en milieu BO.

Premier choix :

- a) *La totalité du volume en milieu de base (B).*

Pour cela :

1° Verser dans un ballon contenant 160 ml d'osséine à 4 p. 100 stérile et à pH 6,8, préalablement fluidifiée par chauffage au bain-marie ou par séjour à l'étuve à 37° pendant trente minutes, 16 ml de vert malachite à 2 p. 100 et remuer énergiquement.

2° Verser le mélange osséine à 4 p. 100 + vert malachite dans le ballon contenant les œufs et la solution de sels et remuer jusqu'à ce que le milieu soit d'une teinte homogène.

3° Placer le milieu terminé à l'étuve à 37° pendant une heure, avant de procéder à la répartition dans des tubes de 170 × 17 mm *encochés*.

Deuxième choix :

- b) *La totalité du volume en milieu BO (base + osséine à 20 p. 100 exsudée).*

Pour cela :

Verser dans un ballon contenant 160 ml d'osséine à 20 p. 100 stérile et à pH 6,8 (préalablement fluidifiée) 16 ml de vert malachite à 2 p. 100.

Ensuite, procéder exactement comme pour le milieu de base.

Troisième choix :

- c) *Moitié du volume en milieu de base (B) ; moitié du volume en milieu BO.*

Pour cela procéder comme suit :

Partager le mélange œufs-sels-oligo-éléments, etc. en deux parties égales dans deux ballons stériles (environ 710 ml dans chacun).

Dans le ballon I (milieu de base pour culture en surface).

Ajouter aux 710 ml de milieu un mélange de 8 ml de vert mala-

chite à 2 p. 100 et de 80 ml d'osséine à 4 p. 100. Remuer énergiquement et placer le ballon à l'étuve à 37°, une heure.

Dans le ballon II (milieu BO pour la culture « sous cape ».

Ajouter aux 710 ml de milieu, un mélange de 8 ml de vert malachite à 2 p. 100 et de 80 ml d'osséine à 20 p. 100. Remuer énergiquement et placer à l'étuve à 37° pendant une heure.

RÉPARTITION.

Répartir séparément et successivement le milieu de base contenu dans le ballon I et le milieu BO contenu dans le ballon II.

Le milieu, après un séjour d'une heure à l'étuve à 37° sera remué énergiquement et réparti aussitôt dans des tubes stériles de 170 × 17 mm encochés à 6 cm du goulot, à raison de 6,5 ml par tube.

Il importe, lors de la distribution, de remuer le ballon de temps en temps afin d'éviter la sédimentation du milieu.

La coagulation sera effectuée à la chaleur humide (coagulateur saturé de vapeur d'eau purifiée) en un seul temps, à 85° pendant quarante-cinq minutes.

Le milieu sera coagulé en position rigoureusement *horizontale*, l'encoche de 5 mm de profondeur rend cette opération très aisée. Surface offerte à la culture, 15 cm².

EXSUDATION DE L'OSSEÏNE DU MILIEU BO.

Seul le milieu BO ayant reçu de l'osséine à 20 p. 100 exsudera une partie de cette osséine à la partie inférieure du milieu. Pour obtenir cette exsudation opérer comme suit :

Dès leur sortie du coagulateur, les tubes contenant le milieu BO sont rangés en position rigoureusement verticale très serrés les uns contre les autres, dans une caisse à plusieurs casiers et placés dans une pièce chaude ou dans une étuve à 30° pendant environ douze heures.

Ce délai passé, les tubes sont capuchonnés. Un gel de 0,3 ml occupe le fond des tubes qui seront conservés à la glacière à 4° ainsi que les tubes de milieu de base (B) pour lesquels aucune disposition particulière n'est nécessaire après la fin de la coagulation.

Nous tenons à préciser que la conservation de tous les milieux à l'œuf doit être effectuée à l'abri de la lumière du jour, car quelques heures suffisent pour abaisser leur sensibilité de 50 p. 100.

Pour les milieux qui doivent être ensemencés dans les huit jours qui suivent la date de leur préparation, la conservation à la glacière à 4° n'offre aucun avantage.

INDICATIONS RESPECTIVES DES MILIEUX
ET DES MODALITÉS DE CULTURE

D'une façon très schématique les indications respectives des milieux et des modalités de culture que nous suggérons sont les suivantes :

1° Pour les bacilles dits ou supposés normaux, provenant des voies respiratoires (expectoration, tubage gastrique, broncho-aspiration, prélèvements laryngo-trachéaux) et d'une façon générale pour tous les bacilles en voie de multiplication active, les meilleurs résultats — en nombre, rapidité d'apparition et luxuriance des colonies — sont obtenus *sur milieu de base (B) par culture en surface* telle qu'elle se pratique habituellement.

2° Pour les bacilles d'origine extra-pulmonaire (urines, L. C.-R., épanchements S. F. et prélèvements de biopsie) les meilleurs résultats sont obtenus par *la culture « sous cape »* sur milieu BO (milieu de base + osséine à 20 p. 100 exsudée à la partie inférieure du milieu). Par cette modalité les bacilles sont enrobés d'une mince pellicule d'osséine qui les protège du contact de l'air atmosphérique durant la phase initiale de la culture tout en leur laissant le loisir d'accéder à l'air libre après un certain nombre de divisions cellulaires.

Ce mode de culture facilite le développement *in vitro* des bacilles « quiescents » et de *M. t.* variété *bovis* qui, comme on le sait, occasionne par prédilection des lésions extra-pulmonaires.

3° *La culture en « double couche nutritive »*, et tout spécialement la culture en présence d'extraits organiques provenant du singe, se révèle d'autant plus indiquée et efficace que le nombre des bacilles en état de souffrance est élevé et leur inaptitude à la biosynthèse *in vitro* prononcée.

Ce mode de culture est réalisé par l'introduction dans des tubes contenant du milieu de base (B) ou BO, juste avant l'ensemencement, de V gouttes de pulpe d'organes de singe préparée et conservée comme indiqué plus haut.

TECHNIQUE D'ENSEMENCEMENT.

S'entourer des précautions indiquées [4], à savoir :

1° Arrêt de l'antibiothérapie les jours qui précèdent le prélèvement.

2° Utiliser des prélèvements frais.

3° Ne jamais utiliser l'eau salée à 9 p. 1 000, eau dite physiologique, dans les manipulations.

4° Eviter les centrifugations rapides et prolongées.

5° Eviter la purification-homogénéisation pour les prélèvements stériles (L. C.-R., liquides S. F. stériles, etc.).

6° Traiter pendant le minimum de temps et avec la plus faible concentration de la substance homogénéisante, les produits infectés.

7° Faire séjourner les milieux trente minutes à l'étuve à 37° en position verticale avant de les ensemençer.

8° Veiller à ce que les milieux de culture ne soient jamais exposés au rayonnement solaire.

9° Utiliser un nombre de tubes suffisant : quatre tubes de chaque variante qui seront ensemençés, de préférence avec une pipette graduée, à raison de 0,25 ml par tube (2).

10° Capuchonner les tubes aussitôt, l'humidité résiduelle étant favorable au démarrage de la culture, et les placer à l'étuve en position horizontale alignés soit sur un portoir prévu pour des tubes encochés, soit sur un plateau muni d'une baguette de verre plein placée sous l'encoche des tubes.

RÉSULTATS

Ils sont fonction de l'origine, de la nature et de l'état physiopathologique des bacilles contenus dans le prélèvement.

Aspects des colonies. — Par comparaison avec le milieu de Jensen les colonies sont plus humides et leur morphologie varie suivant les prélèvements : étalées, surélevées, en couronne ou déprimées au centre (pl. I, fig. 1 et 2).

Précocité. — Elles sont d'autant plus précoces par rapport au Jensen que les bacilles qui leur donnent naissance sont plus perturbés dans leur métabolisme. Cette avance, peu significative pour les bacilles de vitalité normale, est de l'ordre d'une à plusieurs semaines pour les bacilles carencés et dysgoniques.

Luxuriance. — Quels que soient la nature et le type des bacilles, la taille des colonies obtenues est toujours supérieure à celle sur milieu de Jensen. Elle varie de 1 à 10 mm de diamètre et le poids de 5 mg par colonie est rapidement atteint et dépassé.

(2) Si l'on ne dispose pas de milieu BO (milieu de base + osséine transitée et exsudée par le milieu) il est encore très facile de réaliser la culture « sous cape ». Pour cela, ajouter stérilement et avant ensemencement sur quelques tubes contenant du milieu de base coagulé, V gouttes d'osséine à 4 p. 100 préalablement fluidifiée.

Précisons aussi qu'en plus des extraits organiques provenant du singe, toutes sortes d'associations avec des vitamines ou autres substances peuvent être réalisées extemporanément.

Nombre. — Il constitue l'élément d'appréciation le plus important pour la sensibilité comparée entre deux milieux. Ici encore l'écart est d'autant plus grand entre nos milieux et le milieu de Jensen que les difficultés éprouvées pour la culture sur ce dernier sont plus prononcées.

1° Pour les bacilles provenant des voies respiratoires en libre communication avec les bronches, non attaqués par les antibiotiques et doués d'une vitalité normale, il y a peu ou pas de différence entre le milieu de Jensen et le milieu de base, tous deux assurant la culture en surface.

En outre, et cela uniquement pour les bacilles en plein essor de développement, les colonies sont nettement moins nombreuses sur milieu BO (culture « sous cape ») et sur milieux enrichis d'extraits d'organes (culture en double couche »).

Cela est dû au fait que les bacilles normaux et en voie de multiplication active sont plus avides d'air que de substances stimulantes supplémentaires.

2° Pour les bacilles d'origine extra-pulmonaire et les bacilles du type bovin, le nombre de colonies est parfois à égalité sur le milieu de Jensen et le milieu de base, mais l'apparition de colonies macroscopiques sur milieu de base et BO (culture « sous cape ») est toujours en avance d'une à plusieurs semaines. En outre, la taille de ces colonies est de deux à quatre fois supérieure (pl. II, fig. 3 et 4).

3° Pour les bacilles en « état de quiescence », pour ceux attaqués par les antibiotiques, et *a fortiori* pour les bacilles profondément perturbés dans leur métabolisme — bacilles dits « visibles et non viables » — les différences de culture sont telles qu'il ne saurait être question d'établir un parallèle (pl. III, fig. 5 et 6, pl. IV, fig. 7 et 8).

En effet la culture sur nos milieux, et en particulier la culture « sous cape » et en « double couche », peut être en avance d'une à plusieurs semaines sur la culture en surface et donner un nombre de colonies deux à dix fois plus élevé. Dans certains cas la culture est positive, alors qu'elle demeure aléatoire (colonies non repiquables) ou totalement négative sur milieu de Jensen.

En conclusion : Le « potentiel » de vitalité et de viabilité des bacilles issus directement de l'organisme étant inconnu et imprévisible, l'hétérogénéité et hétérotrophie pour toute population bacillaire attaquée par les antibiotiques étant la règle, le mode de culture unique ne peut plus être envisagé et considéré comme suffisant.

Aussi et tenant compte des exigences très particulières des bacilles perturbés dans leur métabolisme, l'utilisation de milieux encore plus riches que les milieux usuels et les modalités de

culture variées (en surface, « sous cape » et en « double couche ») s'imposent.

En procédant ainsi, même avec des bacilles dits « visibles et non viables », les échecs de culture deviennent tout à fait exceptionnels.

DISCUSSION.

De nos constatations personnelles il ressort que parmi les bacilles réputés non viables, réanimés par la culture « sous cape » et en « double couche », tous les types depuis les sensibles jusqu'aux poly-résistants peuvent être représentés.

L'étude qualitative et quantitative de la sensibilité aux antibiotiques et de l'activité catalasique globale ou individuelle des colonies obtenues à partir des bacilles apparemment non viables atteste la diversité et l'hétérogénéité de ces souches.

L'hypothèse d'après laquelle les bacilles réputés « visibles et non viables » seraient *a priori* et presque obligatoirement des INH-résistants ne se trouve pas confirmée par les faits.

Cependant, compte tenu de ce que la résistance à l'INH est très fréquente, il est tout à fait normal que parmi les souches « réanimées » nous rencontrions davantage d'INH-résistantes.

Il nous est apparu, par contre, que parmi les bacilles difficiles ou impossibles à cultiver sur milieux usuels, nombre d'entre eux étaient stimulés par de très faibles taux (0,05-0,1 μ g) de PAS (effet salicylique probable) [26, 27, 28].

Par ailleurs, la révélation d'éléments quiescents et sensibles au sein d'une population dans son immense majorité résistante n'a rien d'étonnant [5]. De même l'éventualité d'une sélection possible à la faveur de repiquages ou par passage au cobaye n'est pas à écarter, les éléments les plus vigoureux ayant la préférence sur les autres.

Pour notre part nous pensons que les bacilles réanimés sont à l'image de ce qu'ils étaient au moment de leur entrée en quiescence.

Ce que, malgré les apparences, il serait inexact d'admettre, c'est l'éventualité d'une mutation vers la virulence des bacilles avirulents, à la faveur de conditions de culture particulières.

Des évolutions cliniques survenues chez des malades éliminant des bacilles non viables que nous avions « réanimés » quelques semaines ou mois auparavant :

a) attestent de la permanence d'unités ou groupements bacillaires virulents au sein de populations réputées avirulentes ou non viables ;

b) confirment l'intérêt des modalités de culture variées pour démasquer ces bacilles ;

c) infirment l'hypothèse peu vraisemblable d'une mutation des bacilles avirulents en bacilles virulents.

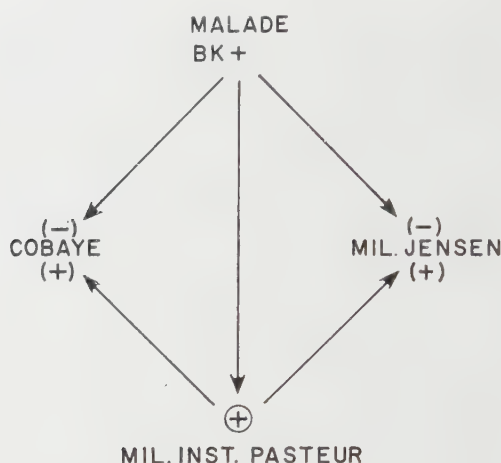


FIG. 1.

Dans ce but et afin d'écartier toute crainte hypothétique d'un retour à la virulence des souches avirulentes — par le truchement de nos milieux — nous avons procédé à l'expérience suivante :

Des cobayes ont été inoculés avec du BCG provenant de milieu de Jensen et avec du BCG ayant subi plusieurs passages sur nos milieux.

Or aucune différence n'a été notée entre les deux lots de cobayes à brève ou longue échéance.

Ce que nous pouvons avancer avec certitude c'est que dans maints cas nos milieux constituent un « relais » entre l'organisme humain et l'organisme du cobaye d'une part, et entre le produit

PLANCHE I

Aspects macroscopiques habituels des colonies bacillaires.

FIG. 1. — Sur milieu de Jensen.

FIG. 2. — Sur milieux TB Institut Pasteur.

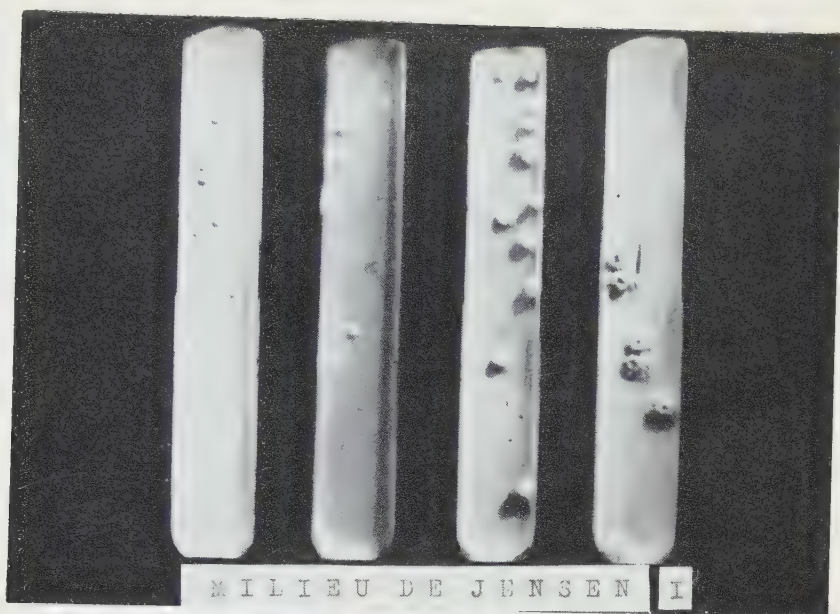


PLANCHE II

FIG 3. — M. N... Prélèvement chirurgical (tuberculose du carpe). De gauche à droite : milieu de Jensen, 2 tubes : culture négative ; milieu de base (culture en surface), 2 tubes : 8 colonies ; milieu BO (culture sous cape), 2 tubes : 16 colonies ; milieu BFS (culture en double couche nutritive), 2 tubes : 60 colonies.

FIG 4. — Enfant L... L. C.-R. De gauche à droite : milieu de Jensen, 3 tubes : culture négative ; milieu de base (culture en surface), 3 tubes : une seule colonie ; milieu BO (culture sous cape), 3 tubes : 9 colonies ; milieu BFS (culture en double couche nutritive), 3 tubes : une seule colonie.

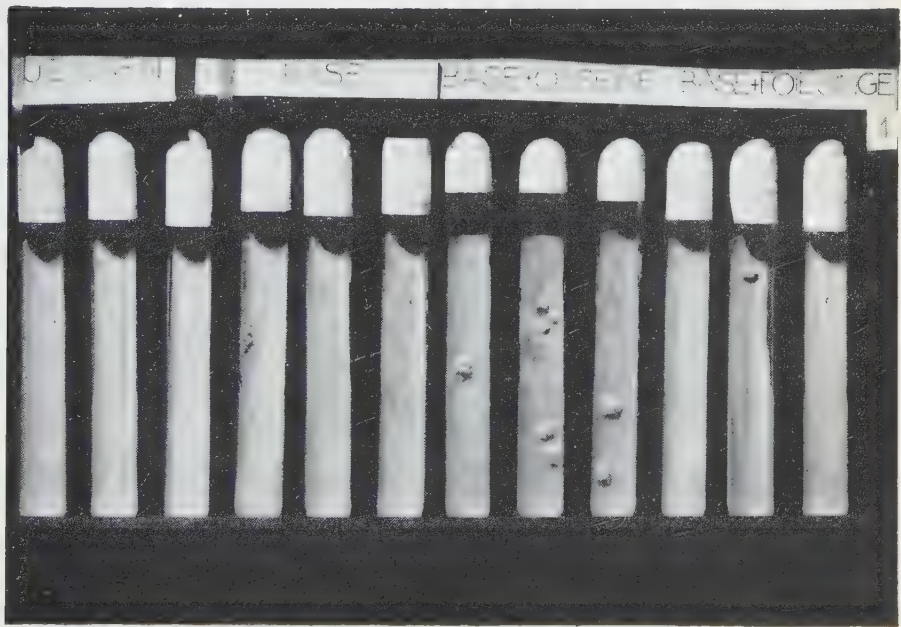
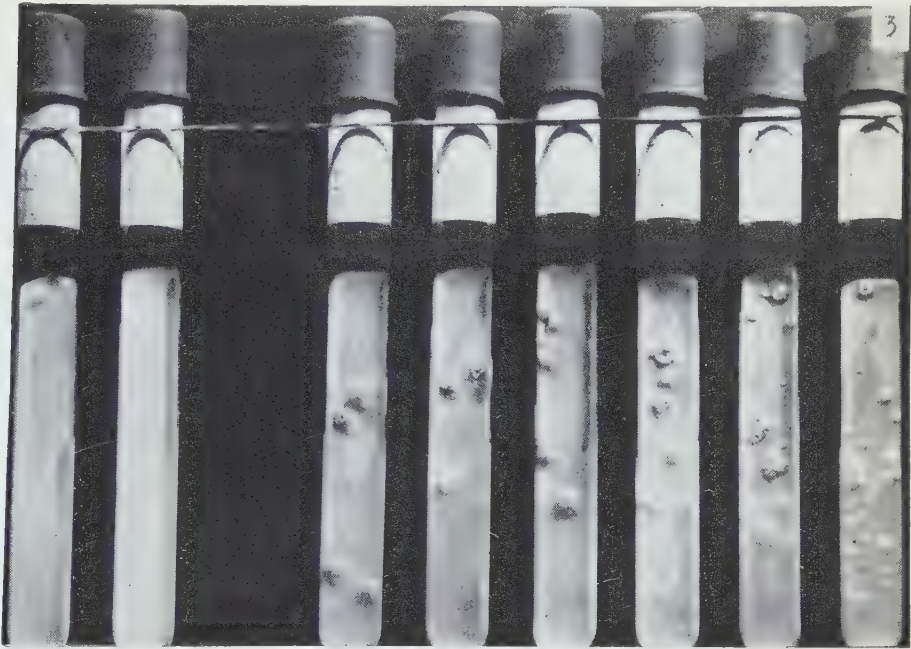


PLANCHE II.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

PLANCHE III

FIG. 5. — M^{me} M... Expectoration (examen microscopique : 2 bacilles par champ). De gauche à droite : milieu de Jensen, 2 tubes : rares colonies à la limite de la visibilité, non repiquables ; milieu de base (culture en surface), 2 tubes : 30 colonies dont 15 eugoniques ; milieu BO (culture sous cape), 2 tubes : 40 colonies dont 25 eugoniques ; milieu BFS (culture en double couche nutritive), 2 tubes : 50 à 60 colonies par tube dont 50 p. 100 d'eugoniques.

FIG. 6. — M. C... Urines (tuberculose rénale chronique). De gauche à droite : milieu de Jensen, 2 tubes : une seule colonie ; milieu de base (culture en surface), 2 tubes : 5 colonies ; milieu BFS (culture en double couche nutritive), 4 tubes : 80 à 100 colonies par tube.

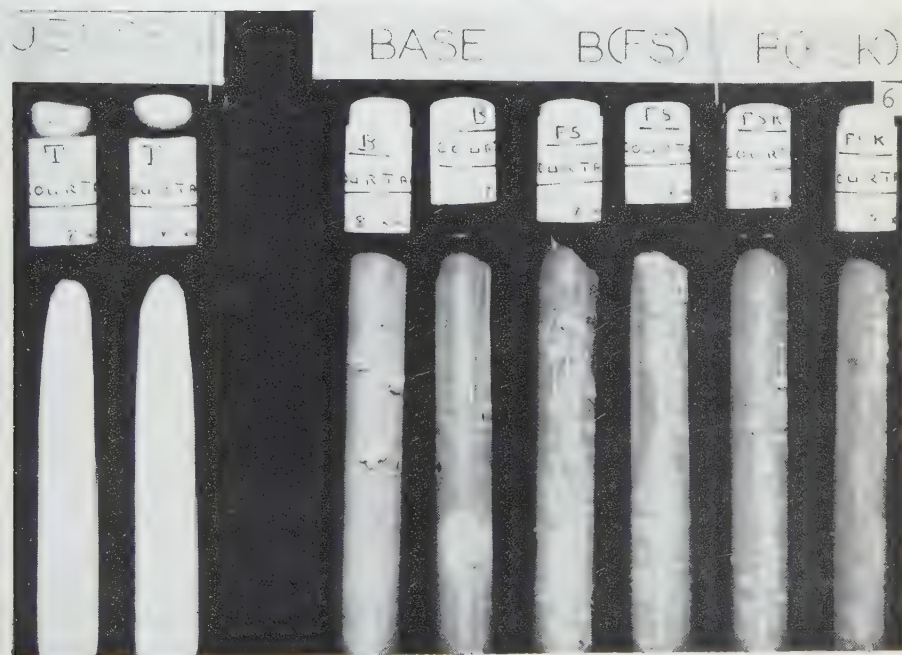
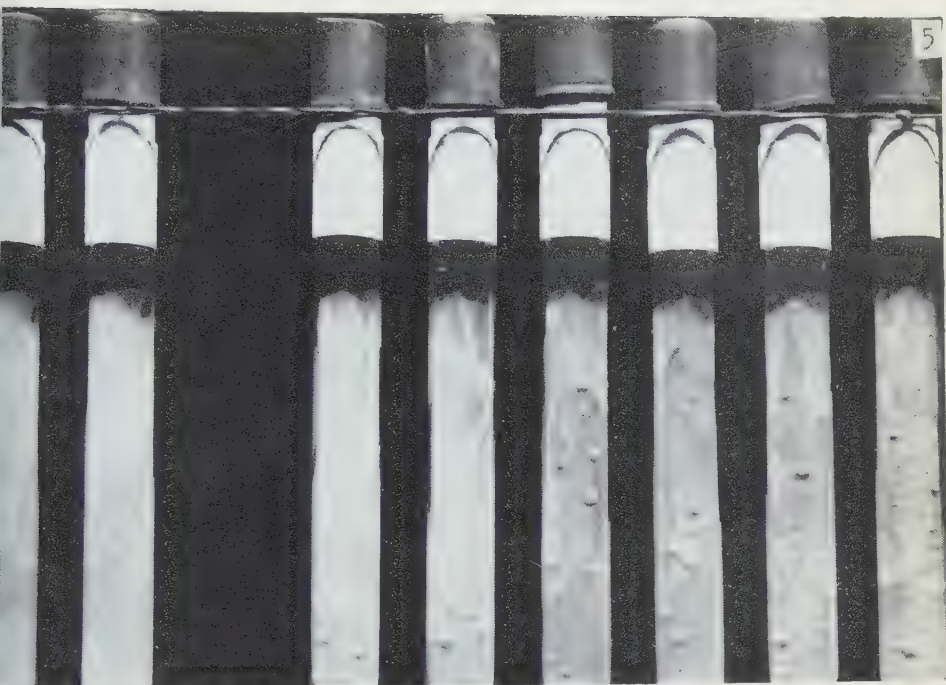


PLANCHE III.

PLANCHE IV

FIG. 7. — M^{me} V... Expectoration (examen microscopique : 2 à 4 bacilles par champ). De gauche à droite : milieu de Jensen, 2 tubes : 2 colonies à la limite de la visibilité ; milieu de base (culture en surface), 2 tubes : 3 colonies géantes ; milieu BO (culture sous cape), 2 tubes : 10 grosses colonies ; milieu BFS (culture en double couche nutritive) : 12 grosses colonies plus 20 petites.

FIG. 8. — M. K... Expectoration (examen microscopique : 50 bacilles par champ). 1. Culture sur Jensen : négative à plusieurs reprises ; 2. Sur milieu de base (culture en surface) : une seule colonie ; 3. Culture en présence d'extraits organiques : 2 colonies ; 4. Extraits organiques + Vit. K. : 150 à 200 colonies par tube ; 5. Extraits organiques + traces de P. A. B. : 4 colonies par tube.

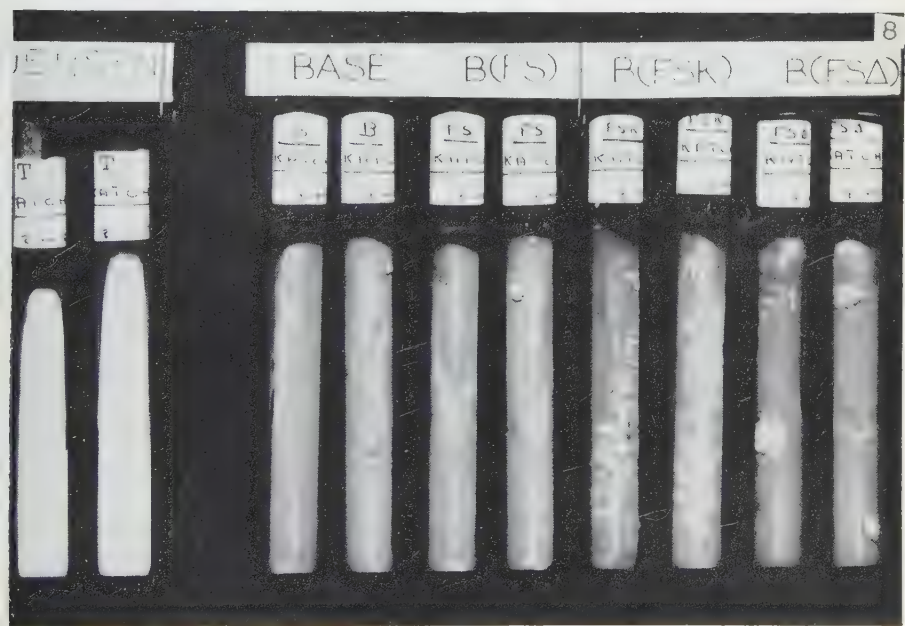
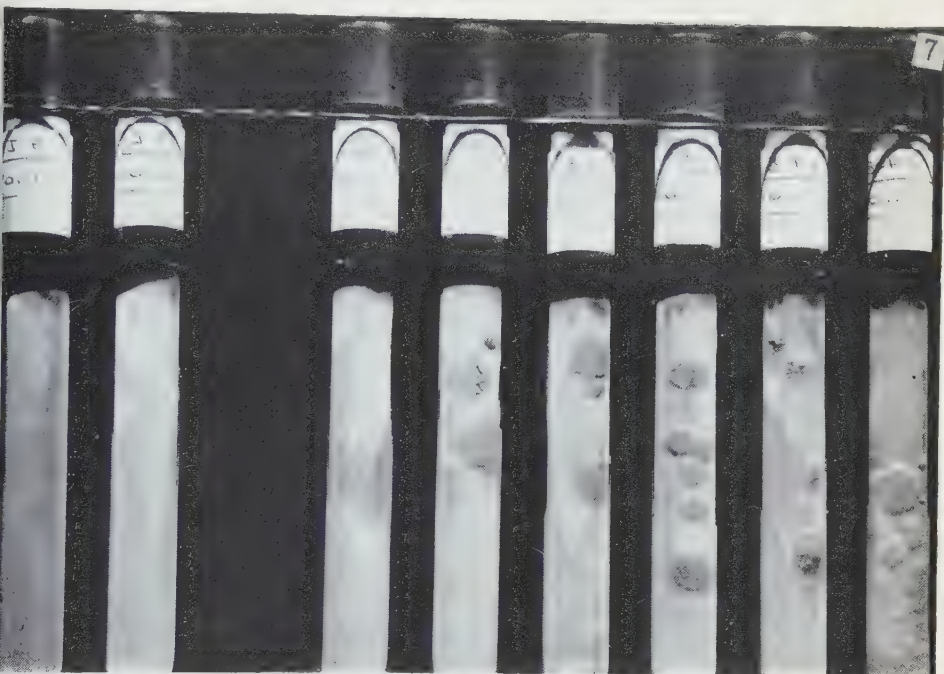
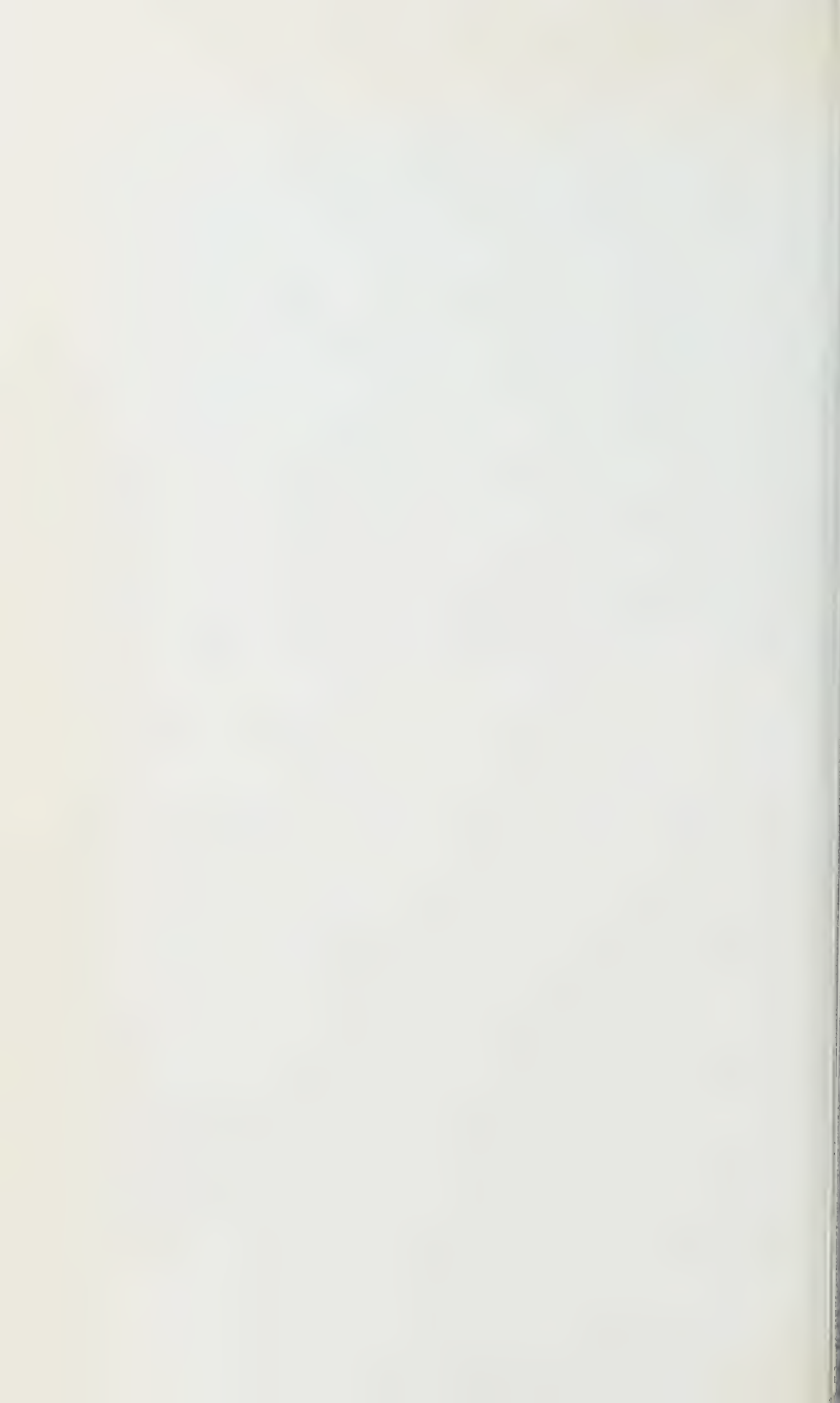


PLANCHE IV.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS



pathologique bacillifère et les milieux usuels d'autre part. Ce qui pourrait être schématisé comme indiqué dans la figure 1.

Il arrive cependant que l'ensemencement sur milieu de Jensen d'organes de cobaye tuberculisé par inoculation de bacilles réanimés sur nos milieux échoue partiellement ou totalement et que la culture « sous cape » et en « double couche » soit à nouveau nécessaire pour récupérer la souche.

CONCLUSIONS.

A la lumière de nos recherches il apparaît que les bacilles réputés « visibles et non viables » sont en réalité des bacilles de vitalité réduite, de viabilité éphémère ou en « état de quiescence ».

La culture en surface sur milieux usuels est insuffisante et assez souvent impuissante pour assurer leur développement.

Pour y remédier, nous avons mis au point un milieu à l'œuf enrichi d'oligo-éléments, de pyruvate, de glutamate de sodium et d'osséine.

Ce milieu de base, plus sensible que le milieu de Löwenstein-Jensen, se prête à la réalisation de trois modalités de culture :

1° *En surface* (milieu de base) telle qu'elle se pratique habituellement assurant le développement des bacilles de vitalité normale ou faiblement réduite.

2° « *Sous cape* » (milieu de base + osséine exsudée = BO) :

- a) protège les bacilles du contact direct de l'air atmosphérique à la phase initiale ;
- b) accélère la croissance des bacilles d'origine extra-pulmonaire ;
- c) révèle les bacilles en « état de quiescence ».

3° En « *double couche* » (milieu de base ou BO + extraits d'organes de singe ajoutés à la surface) :

- a) favorise la croissance des bacilles profondément perturbés dans leur métabolisme ;
- b) stimule la multiplication des bacilles « quiescents » ;
- c) assure la réanimation des bacilles peu aptes à la biosynthèse *in vitro* et *in vivo* (dans l'organisme du cobaye) considérés comme non viables.

La révélation *in vitro* des bacilles quiescents, la réanimation des bacilles considérés jusqu'alors comme peu ou pas viables, la mise en évidence de leur pouvoir pathogène pour le cobaye, éclairent d'un jour nouveau certains problèmes d'ordre pathogénique et épidémiologique non encore élucidés.

SUMMARY

MEDIA AND METHODS OF CULTURE ADAPTED TO THE REANIMATION AND MULTIPLICATION « IN VITRO » OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS OF REDUCED VITALITY, EPHEMERAL VIABILITY OR IN A STATE OF QUIESCENCE.

In the light of our investigations, it appears that the bacilli described as « visible and non-viable » are actually bacilli of reduced vitality, of ephemeral viability or « in a state of quiescence ».

Often enough surface culturing on the usual media is insufficient, being incapable of ensuring their development.

To remedy this, we have prepared an egg-medium enriched with oligo-elements, pyruvate and glutamate of sodium, and ossein.

This basic medium which is more sensitive than the Löwenstein-Jensen medium, can be used for three methods of culture :

1. *Surface culture* (basic medium) such as usually practised, assuring the development of bacilli of normal or only slightly reduced vitality.

2. « *Sous cape* » culture (basic medium + exuded ossein = BO) :

- a) Protects the bacilli from direct contact with air in the initial stage,
- b) Accelerates the growth of bacilli of extra-pulmonary origin,
- c) Reveals bacilli which are in a state of quiescence.

3. « *Double layer* » culture (basic medium or BO medium + extracts of monkey organs added to the surface) :

- a) Favours the growth of bacilli with greatly disturbed metabolism,
- b) Stimulates the multiplication of « quiescent bacilli »,
- c) Ensures the reanimation of bacilli hardly able to realise biosynthesis *in vitro* and *in vivo* (in guinea pigs) and for this reason considered as non-viable until to-day.

The demonstration *in vitro* of quiescent bacilli, the reanimation of bacilli considered until now as non or only slightly viable, the confirmation of their pathogenicity for guinea-pigs, throw new light on certain problems of a pathogenic and epidemiological nature which had not previously been solved.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERNARD (E.), LOTTE (M^{lle} A.) et PRETET (S.). *Bull. Acad. Méd.*, 1959, **143**, 462.
- [2] JENSEN (K. A.). *Bull. Union intern. Tub.*, 1952, **22**, 16.
- [3] COLETSOS (P. J.), ORIOU (E.), REGEL (N. DE) et MACHAVOINE (M. G.). *Bull. Acad. Méd.*, 1959, **143**, 479.
- [4] COLETSOS (P. J.), ORIOU (E.), REGEL (N. DE) et MACHAVOINE (M. G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 135.
- [5] COLETSOS (P. J.), ORIOU (E.), REGEL (N. DE) et MACHAVOINE (M. G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 210.
- [6] DUBOS (R. J.) et DAVIS (B. D.). *J. exp. Med.*, 1946, **83**, 409 ; 1947, **86**, 215.
- [7] DUBOS (R. J.). *J. exp. Med.*, 1947, **85**, 9 ; 1948, **88**, 73.
- [8] DUBOS (R. J.), DAVIS (B. D.), MIDDLEBROOK (G.) et PIERCE (C.). *Am. Rev. Tub.*, 1946, **54**, 204.
- [9] YOUNG (G. P.) et KARLSON (A. G.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **55**, 528.
- [10] DUBOS (R. J.) et MIDDLEBROOK (G.). *Am. Rev. Tub.*, 1947, **56**, 334. *J. exp. Med.*, 1948, **88**, 81.
- [11] DUBOS (R. J.) et NOUFFLARD (M^{lle} H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1950, **78**, 208.
- [12] MELVIN (I.), KLEIN (G. C.), JONES (N.) et CUMMINGS (M. M.). *Am. Rev. Tub.*, 1951, **63**, 459.
- [13] CALMELS (J. R.) et BOISVERT (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 338.
- [14] BERGE (S. J.) et TUCKER (E. B.). *Am. Rev. Tub.*, 1960, **81**, 595.
- [15] DORSET. *J. Am. Med. Assoc.*, 1902, 555.
- [16] LÖWENSTEIN. *Deut. Med. Wschr.*, 1930, 1010. *Zbl. Bakt.*, 1931, **120**, 127.
- [17] HEROLD (R. D.). *J. inf. Dis.*, 1931, **48**, 236.
- [18] PETRAGNANI. *Boll. Ist. sier. milan.*, 1926, n° 3, 173.
- [19] AMERICAN TRUDEAU SOCIETY (A. T. S.). *Am. Rev. Tub.*, 1946, **54**, 428.
- [20] JENSEN (K. A.). *Zbl. Bakt.*, 1932, **125**, 222. *Acta Tub. Scand.*, 1940, **14**, 125. *Bull. Union intern. Tub.*, 1954, **24**, 81.
- [21] COLETSOS (P. J.). *C. R. Conf. intern. Madrid*, 1954, 374.
- [22] MIDDLEBROOK (G.) et COHN (M. L.). *Am. J. publ. Hlth*, 1958, **48**, 844.
- [23] FICHER (M. W.). *Am. Rev. Tub.*, 1954, **69**, 797.
- [24] COLETSOS (P. J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **248**, 3497.
- [25] BERTHELOT (A.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1934, **16**, 1553.
- [26] BERNHEIM (F.). *J. Bact.*, 1941, **41**, 387.
- [27] LEHMANN (J.). *Lancet*, 1946, **1**, 15.
- [28] BÖNICKE (R.). *Bull. Union intern. Tub.*, 1957, **27**, 151.

SURVIE ET MULTIPLICATION DU BCG ET DU BACILLE TUBERCULEUX CHEZ LA SOURIS

II. — COMPARAISON DE VACCINS BCG LYOPHILISÉS PRÉPARÉS A PARTIR DE CULTURES DE TROIS AGES DIFFÉRENTS

par M. PANISSET (*), J.-Cl. BENOIT (*), A. FRAPPIER (*)
et J. SAINT-PIERRE (**) (***).

Nous avons fait connaître une méthode [1] qui permet d'évaluer le pouvoir immunisant du BCG pour la souris contre une infection tuberculeuse expérimentale.

Le travail que nous présentons a été consacré à la comparaison du pouvoir immunisant de trois vaccins BCG lyophilisés qui ne différaient que par les âges respectifs des voiles avec lesquels ils avaient été préparés.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

Vaccin BCG. — Le vaccin qui fait l'objet de cette expérience a été reçu du laboratoire de préparation du BCG de l'Institut de Microbiologie et d'Hygiène de l'Université de Montréal. Les ampoules ne portent aucune autre indication que le numéro du lot de préparation du vaccin et le numéro de « randomisation » (1) de l'ampoule. Nous savons que les trois lots différents ont été préparés simultanément, dans une même opération, avec des voiles âgés respectivement de 7, 14 et 21 jours, et que la lyophilisation a été effectuée sur une suspension concentrée à 240 mg/ml.

La suspension vaccinale est préparée en reconstituant avec 2 ml d'eau distillée le contenu de deux ampoules portant le même numéro de lot (150, 320 ou 600).

(*) Institut de Microbiologie et d'Hygiène ; Ecole d'Hygiène de l'Université de Montréal.

(**) Centre de Statistiques, Université de Montréal.

(***) Société Française de Microbiologie, séance du 5 mai 1960.

(1) Ce néologisme d'origine anglo-saxonne est couramment employé par les statisticiens pour signifier qu'un choix aléatoire a été effectué. Cf. *Théorie de la randomisation*, par Y. Morillon. *Rev. Statistique appl.*, 1960, 8, n° 1.

PLAN GÉNÉRAL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES. — Nous avons suivi le plan général de travail et avons employé les méthodes expérimentales que nous avons exposées dans notre « Etude d'une méthode de mesure » [1]. En particulier, les souris anesthésiées au nembutal et « randomisées » reçoivent par la voie jugulaire 0,25 ml d'une dilution à 10^{-2} mg/ml ou à 10^{-3} mg/ml du vaccin et quatre semaines plus tard elles sont infectées avec 5 000 unités viables de bacilles tuberculeux (*M. tuberculosis* var. *hominis* H37Rv) et sacrifiées quatorze jours après. La numération des unités viables présentes dans la rate est effectuée à l'aide des techniques que nous avons décrites.

Protocole des épreuves effectuées sur les trois vaccins (voir tableau II).

NUMÉRATION DES UNITÉS VIBLES DE BCG INOCULÉES. — La dose de vaccin qui est inoculée ne peut être évaluée que d'après la valeur pondérale qui est indiquée sur l'ampoule. Les numérations dont nous indiquons ici les résultats représentent une donnée de contrôle obtenue *a posteriori* (tableau I).

TABLEAU I.

	BCG No. 150	BCG No. 320	BCG No. 600
Dilution	10^{-3} mg	10^{-3} mg	10^{-3} mg
Nombre de colonies dans chaque flacon (inoculum 0,05 ml)	187	1548	57
	194	1492	48
	189	1861	50
	172		54
	187		52
	189		56
	186	1633	53

Ces numérations sont effectuées à l'aide de la méthode que nous avons décrite [1].

Ainsi les doses administrées aux souris comportaient, pour un inoculum de 0,25 ml :

1° BCG n° 150 : 930 unités viables pour la dilution 10^{-3} mg (9 300 unités calculées pour la dilution 10^{-2} mg) ;

2° BCG n° 320 : 8 165 unités viables pour la dilution 10^{-3} mg (81 650 unités calculées pour la dilution 10^{-2} mg) ;

3° BCG n° 600 : 265 unités viables pour la dilution 10^{-3} mg [2 650 unités calculées pour la dilution 10^{-2} mg] (tableau II).

TABLEAU II.

	Groupes expérimentaux		Nombre d'animaux	Date de vaccination	Date de la surinfection	Date du sacrifice
	Numéros des ampoules	dilution				
BCG, 4 semaines H37iv 2 semaines	150-28	150-40*	12	19-5-59	18-6-59	3-7-59
	320-22	320-24	12	19-5-59	18-6-59	3-7-59
	600-12	600-42	12	19-5-59	18-6-59	3-7-59
	150-28	150-40	12	19-5-59	18-6-59	3-7-59
	320-22	320-24	12	19-5-59	18-6-59	3-7-59
	600-12	600-42	12	19-5-59	18-6-59	3-7-59
BCG seul 6 semaines (4 + 2)	150-28	150-40	5	19-5-59	—	3-7-59
	320-22	320-24	5	19-5-59	—	3-7-59
	600-12	600-42	5	19-5-59	—	3-7-59
	150-28	150-40	5	19-5-59	—	3-7-59
	320-22	320-24	5	19-5-59	—	3-7-59
	600-12	600-42	5	19-5-59	—	3-7-59
H37iv seul, 2 sem.	H37iv seul 4 + 2 sem.		12	—	18-6-59	3-7-59

* Souches de BCG reçues au laboratoire le 29 janvier 1959. Concentration : 2 ampoules par groupe, 240 mg par ampoule, soit 480 mg au total.

TABLEAU III.

Numération des unités viables de l'inoculum virulent	
H37Rv	Dilution 10 ⁻⁵
Nombre de colonies	23
dans chaque	64
flacon	36
	55
	47
(Inoculum .05 ml).	53
	61
	51
Moyennes	49
Dose inoculée : 245 unités viables, (0.25ml de la dilution 10 ⁻⁵).	

TABLEAU IV. — Survie et multiplication du BCG et de H37Rv chez la souris (nombre d'unités viables, récupérables à partir de la rate).

BCG, 4 semaines; H37Rv, 2 semaines.

BCG No. 150; dilution 10⁻²mg

Date	Souris No.	Nombre de colonies par flacon/inoculum .05ml	Moyennes		Unités viables par rate.
2-7-59	1	18-12-16-12-17-12-16-14	15	14	14,000
"	3	2- 3- 5- 7- 5- 1- 5-	4		
"	4	0-15-15- 8-12-25-16-15	13		
"	5	3- 7- 4- 2- 3- 5- 8- 7	5		
"	6	11- 9-14-15-13-15-12-11	11		
"	7	27-21-12-16- c [*] 17-23-16	19		
"	11	16-22-31-31- c-35-19-17	24		
"	12	22-17-26-11-27-25-20-19	21		

BCG No. 150; dilution 10⁻³mg

2-7-59	13	69-85-95-74-74-73-87-70	78	29	29,000
"	15	21-19-25-25-24-24-18-21	22		
"	16	26-25-26-27-31-28-27-27	27		
"	19	8-12- 8- 6- 9-11- 8- 5	8		
"	22	c- c- c- c- c- c- c- c	c		
"	23	7- 4- 6- 9- 8- 7- 3- 2	6		
"	24	32-35-25-30-25-32-32-27	30		

BCG seul 6 semaines

BCG No. 150; dilution 10⁻²mg

3-7-59	74	1- 1- 3- 0- c- 1- 1- 1	1	1	1,000
	77	1- 2- 3- 1- 0- 0- 0- 0	0		

BCG No. 150; dilution 10⁻³mg

3-7-59	73	2- 0- 3- 0- 3- 0- 1- 0	0	1,000	
"	79	1- 0- 3- 3- 2- 0- 2	1		
"	80	0- 0- 0- 0- 0- 0- 0	0		
"	81	1- 2- 1- 2- 2- 2- 0- 0- 0	1		
"	82	0- 0- 1- 0- 1- 2- 1	0		

* Chaque nombre représente le nombre de colonies observées dans chaque flacon.

** Lecture impossible (contamination).

SURINFECTION — L'inoculum est constitué par une culture de six jours de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* H37Rv en milieu de Dubos liquide, entretenue comme nous l'avons

TABLEAU V.

BCG, 4 semaines; H37Rv 2 semaines

BCG No. 320; dilution 10^{-2} mg

Date	Souris No.	Nombre de colonies par flacon (Inoculum .05ml)	Moyennes		Unités viables par rate.
2-7-59	25	2* 3- 2- 5- 3- 7- 2- 2	3	6	6,000
"	28	8- 4- 6- 8- 6- 9- 9- 5	7		
"	29	10- 6- 6- 6-11- 7-13-10	9		
"	32	1- 3- 4- 4- 3- 2- 3- 7	3		
"	33	7- 9- 8* 5- 1- 6- 6- 4	5		
"	34	7-12- 7- c- 8-10- 5- 7	8		
"	36	4- 2- 7- 3- 4- 5- 9- 5	5		

BCG No. 320; dilution 10^{-3} mg

2-7-59	37	8- 5- 6- 8- 8- 4- c- 6	6	6	6,000
"	39	3- 3- 0- 2- 3- 2- 2- 3	3		
"	40	7-16-16-15-23-10-10-12	14		
"	41	16-11-11- 7-14-22-10-12	13		
"	42	3- 4- 6-10- 2- 6- 3- 7	5		
"	45	3- 3- 3- c- 2- c- 1- 0	2		
"	46	8- 6- 6- 4- 3- 6- 4- 6	5		
"	47	8- 3- 5- 2- 6- 4- 4- 2	4		
"	48	5- 7- 2- 5- 2- 5- 1- 9	5		

BCG seul 6 semaines

BCG No. 320; dilution 10^{-2} mg

3-7-59	83	20-19-17-11-22-21-20-24	19	8	8,000
"	84	10-14-16-11-14-17-20-22	14		
"	85	1- 3- 4- 3- 2- 1- 9- 0	3		
"	86	1- 4- 2- 2- 1- 3- 2- 1	2		
"	87	3- 7- 1- 2- 3- 3- 1- 1	2		

BCG No. 320; dilution 10^{-3} mg

3-7-59	88	5- 0- 0- 3- 5- 4- 0- 2	2	4	4,000
"	89	1- 6- 5- 2- 0- 2- 2- 2	2		
"	90	4- 6- 5- 8- 5- 3- 4- 5	5		
"	91	0- 0-16-14-10-16- 8-18	10		
"	92	2- 1- 1- 1- 4- 5- 4- 0	2		

* Même légende que tableau IV.

indiqué [4]. Sa densité mesurée au spectrophotomètre correspond à 0,2 mg/ml. La dilution 10^{-5} mg est préparée à partir de cette culture (tableau III).

INTERPRÉTATIONS DES RÉSULTATS. — Il est évident, à la lecture des tableaux IV, V et VI, que les trois vaccins protègent les

TABLEAU VI.

BCG; 4 semaines; H37Rv 2 semaines

BCG No. 600; dilution 10^{-2} mg

Date	Souris No.	Nombre de colonies par flacon (inoculum 0.05ml).	Moyennes		Unités viables par rate.
2-7-59	49	75- 81- 59- 82- 76- 78- 71- 67	77	36	36,000
"	50	17- 24- 11- 21- 23- 20- 15- 17	19		
"	52	24- 31- 25- 22- 27- 29- 31- 32	28		
"	53	4- 7- 4- 6- 13- 17- 12- 9	9		
"	55	37- 51- 43- 50- 44- 39- 40- 39	43		
"	57	10- 12- 22- 22- 27- 14- 25- 13	18		
"	58	83- 85- 79- 82- 75- 74- 77- 71	78		
"	59	5- 4- 6- 8- 3- 3- 6- 4	5		
"	60	32- 43- 49- 45- 39- 43- 46- 56	44		

BCG No. 600; dilution 10^{-3} mg

3-7-59	62	5- 6- 3- 7- 6- 4- 8- 6	6	32	32,000
"	63	32- 42- 58- 59- 43- 35- 49- 53	46		
"	66	93- 76- c- c- 82- 53- 83- 88	79		
"	67	21- 19- 23- 30- 12- 9- 9- 12	17		
"	68	2- 8- 9- 10- 11- 11- 9- 11	9		
"	69	36- 29- 24- 25- 28- 34- 25- 27	29		
" =	71	55- 41- 47- 46- 45- 1- 49- 51	42		

BCG seul 6 semaines

BCG No. 600; dilution 10^{-2} mg

3-7-59	94	1- 2- 0- 1- 3- 0- 0- 0	1	7	7,000
"	95	0- 0- 0- 0- 0- 0- 0- 0	0		
"	96	21- 31- 20- 9- 22- 23- 24- 33	23		
"	97	2- 4- 3- 3- 6- 2- 5- 2	3		

BCG No. 600; dilution 10^{-3} mg

"	100	0- 0- 0- 0- 0- 0- 1- 0	0	0	0
"	101	0	0		
"	102	0	0		

Témoins H37Rv seul, 2 semaines

"	105	105- 92- 108- 118- 121- 123- 95- 139	112	82	82,000
"	106	73- 87- 88- 100- 95- 123- 88- 75	91		
"	108	64- 77- 77- 86- 81- 74- 86- 72	77		
"	109	116- 121- 122- 129- 125- 127- 109- 112	120		
"	110	58- 45- 55- 48- 43- 54- 43- 44	49		
"	114	48- 53- 49- 39- 40- 39- 38- 42	44		

* Même légende que tableau IV.

TABLEAU VII.

Valeurs moyennes associées aux erreurs 'standard'		
CONCENTRATION 10^{-2}	(+)	CONCENTRATION 10^{-3}
14.0 (2.7)	Groupe BCG No. 150	28.5 (10.7)
5.7 (0.9)	Groupe BCG No. 320	6.3 (1.4)
35.6 (9.1)	Groupe BCG No. 600	32.6 (9.7)
	Témoin:	
	82.2 (12.9)	

* Le nombre entre parenthèses est l'erreur standard de la moyenne correspondante.

souris. Cette protection se traduit par une réduction de la multiplication des bacilles tuberculeux dans la rate. Les expériences antérieures nous ont montré que la multiplication du BCG est indépendante de la multiplication des bacilles virulents inoculés ultérieurement chez le même animal et qu'elle est au maximum de l'ordre de 5 p. 100 du nombre total des unités viables qui peuvent être isolées de la rate. La comparaison des protections conférées par les divers vaccins peut donc être faite sur les valeurs absolues indiquées dans les tableaux IV, V, VI et VII. Les valeurs les plus faibles correspondent, bien entendu, aux groupes expérimentaux les mieux protégés.

Des analyses statistiques qui tiennent compte de la grande

TABLEAU VIII.

<u>Probabilités associées à la valeur de signification</u> <u>des différentes comparaisons</u>		
<u>CONCENTRATION 10⁻²</u>	<u>COMPARAISONS</u>	<u>CONCENTRATION 10⁻³</u>
3% (+)	BCG No 150 vs BCG No 320	10%
5%	BCG No 150 vs BCG No 600	N.S. (++)
1%	BCG No 320 vs BCG No 600	5%
3%	BCG No 600 vs TÉMOINS	3%

* La probabilité indiquée correspond à celle que le hasard seul aurait occasionné des différences de l'ordre de grandeur observé. ** N. S. indique que la différence observée n'est pas significative.

variabilité des mesures permettent d'obtenir les conclusions contenues dans le tableau VIII.

REMARQUES DÉCOULANT DES RÉSULTATS CONTENUS DANS LE TABLEAU VIII :

a) Les résultats obtenus avec le BCG n° 320 sont statistiquement inférieurs à ceux obtenus avec les deux autres BCG.

b) Les résultats du « groupe témoin » sont statistiquement supérieurs à ceux du BCG n° 600.

c) Les résultats obtenus avec le BCG n° 600 sont supérieurs à ceux du BCG n° 150, sauf dans le cas de la concentration 10⁻³ mg où la différence n'est pas significative.

d) Les résultats obtenus avec la concentration 10^{-3} mg concorde avec ceux obtenus à la concentration 10^{-2} mg. Ils ne sont cependant pas aussi significatifs.

CONCLUSION.

Nos résultats expérimentaux et leur étude statistique nous autorisent à classer les échantillons de BCG d'après leur pouvoir protecteur. Ces résultats ont été obtenus sans que les expérimentateurs et le statisticien connaissent l'âge des cultures ayant servi à préparer ces trois vaccins. En introduisant cette donnée, il est possible de conclure que le vaccin n° 320 (voiles de sept jours) immunise mieux que le vaccin n° 150 (voiles de quatorze jours), qui, lui-même immunise mieux que le vaccin n° 600 (voile de vingt et un jours).

Ces résultats confirment les conclusions de nos travaux antérieurs et montrent que notre méthode utilisée avec soin (rigueur des techniques, « randomisation » des animaux et des opérations) peut servir à apprécier des différences assez réduites du pouvoir protecteur de vaccins BCG lyophilisés.

RÉSUMÉ.

Les auteurs ont montré que des vaccins lyophilisés préparés à partir de cultures de 7, 14 et 21 jours possèdent, contre une infection tuberculeuse expérimentale de la souris, un pouvoir protecteur qui est fonction inverse de l'âge des cultures. Ils ont utilisé pour ce faire leur méthode personnelle qui consiste à évaluer la survie et la multiplication au niveau de la rate de la dose de surinfection.

SUMMARY

SURVIVAL AND MULTIPLICATION OF BCG AND TUBERCLE BACILLI IN MICE.

The authors show that freeze-dried BCG vaccines, prepared with 7, 14 and 21 days old cultures, possess a protective capacity inversely proportional to the age of the culture in the vaccination against experimental tuberculosis in mice.

They used their personal method : evaluation of the survival and multiplication of the superinfecting bacilli in the spleen.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PANISSET (M.) et BENOIT (J. D.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **97**, 437-452.
- [2] CHANG SHUEY-SHEN. *J. Formosan med. Ass.*, 1958, **57**, 593-603.
- [3] CHANG SHUEY-SHEN. *J. Formosan med. Ass.*, 1959, **58**, 50-62.

MODIFICATIONS MÉTABOLIQUES ET POUVOIR PATHOGÈNE DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

par M. NASTA, E. PAUNESCO et P. GEORGESCO (*).

(Institut de Phtisiologie, Sos. Viilor 90, Bucarest, Roumanie)

La virulence d'une souche de *Mycobacterium tuberculosis* est appréciée d'après sa capacité de léser l'organisme infecté, les souches déterminant des lésions extensives et progressives, aboutissant à la mort de l'animal inoculé, étant considérées comme « virulentes ». Elles diffèrent des souches « à virulence atténuée » en ce que celles-ci déterminent des lésions limitées, souvent régressives, et n'aboutissant pas à la mort de l'animal.

Ces différents degrés d'extension des lésions correspondent à des potentiels différents de multiplication *in vivo* des bacilles. En outre, la capacité de multiplication dépend de la résistance que le bacille est capable d'opposer aux moyens de défense, spécifiques et non spécifiques, de l'organisme.

Cette résistance est certainement liée à la structure chimique particulière de la cellule bactérienne, qui lui confère un degré de résistance variant d'une souche à l'autre vis-à-vis de l'action des phagocytes et en particulier de certains enzymes bactéricides [22].

C'est aussi très probablement à la structure chimique, et spécialement à la structure du constituant lipidique, qu'est due l'action cytotoxique que certains germes exercent vis-à-vis des éléments tissulaires intéressés au processus de défense de l'organisme [1, 3, 22].

Mais, d'autre part, il ressort des recherches de ces dernières années [5, 10, 12, 27] qu'en plus de ce facteur pour ainsi dire « constitutionnel » ou « structural », la virulence du *M. tuberculosis* est conditionnée également par ses caractéristiques métaboliques. Il est bien établi, entre autres, que les variantes à virulence atténuée manifestent un plus grand besoin d'oxygène que les souches virulentes [10, 12, 27].

(*) Manuscrit reçu le 17 mars 1960.

On peut supposer que pareilles déficiences métaboliques, surtout du métabolisme oxydatif, ne permettent pas aux souches à virulence atténuée de faire face aux conditions particulières créées par les mécanismes de défense de l'organisme [5, 27, 28].

L'étude comparative du métabolisme des souches de *M. tuberculosis* possédant des degrés de virulence différents peut donc apporter des éclaircissements sur les facteurs métaboliques qui accompagnent l'atténuation de la virulence.

Les souches de bacilles isoniazido-résistants, dont la virulence est atténuée à mesure qu'ils acquièrent cette résistance, nous ont semblé un matériel particulièrement propice à cette étude, la possibilité étant ainsi donnée d'étudier le métabolisme d'une même souche à l'état de virulence intégrale et à divers degrés d'atténuation.

MATÉRIEL ET MÉTHODE.

1° Nous avons utilisé pour nos recherches la souche H37Rv (virulente et INH-sensible), sa variante H37Ra (avirulente mais INH-sensible), ainsi que la souche H37Rv R 20 μg d'INH (atténuée et INH résistante). A titre de comparaison nous avons étudié aussi les souches atténuées BCG (INH-sensible), BCG R 100 μg INH (INH-résistante), ainsi que deux souches de bacilles paratuberculeux (*M. phlei* et *M. smegmatis*), toutes les deux avirulentes et possédant une résistance naturelle à 5-20 μg d'INH/ml.

2° Nous avons déterminé comparativement pour toutes ces souches leur faculté d'utiliser, tant en oxybiose qu'en anoxybiose, certains constituants du cycle des acides tricarboxyliques, de l'acétate et de ses précurseurs. En même temps, nous avons étudié comparativement les voies de décarboxylation du pyruvate.

La technique utilisée a été la méthode de Warburg (volume constant et pression variable). Les suspensions bactériennes (*resting cells* en tampon phosphate 0,1 M pH 7,0) ont été préparées en partant de pellicules de cultures sur milieu de Sauton, âgées de 4-5 jours pour les bacilles paratuberculeux, et de 8-12 jours pour les bacilles tuberculeux, la concentration finale des suspensions utilisées étant équivalente à 5-8 mg de bacilles desséchés par millilitre de suspension.

3° L'utilisation de chacune des substances a été étudiée en oxybiose aussi bien qu'en anoxybiose.

Pour l'étude en oxybiose nous avons introduit dans le récipient du manomètre Warburg :

1 ml de suspension bactérienne,

1 ml de solution 0,1 M de la substance étudiée en tampon phosphate 0,1 M à pH 7,

1 ml d'eau bidistillée (ou solution aqueuse des substances dont on recherchait l'effet sur les processus métaboliques étudiés).

Pour l'étude en anoxybiose, nous avons introduit dans le récipient :

1 ml de suspension bactérienne,

1 ml de solution 0,1 M de la substance étudiée en tampon phosphate 0,1 M pH 7,

0,2 ml de solution aqueuse 1 p. 100 de KCN,

0,1 ml de solution aqueuse 5 p. 100 de bleu de méthylène,

0,7 ml d'eau bidistillée (ou solution aqueuse des substances dont on recherchait l'effet sur les processus métaboliques étudiés).

Dans tous les cas, nous avons introduit dans les cupules centrales des récipients de 0,25 ml KOH 15 p. 100, en vue de l'absorption du CO_2 dégagé au cours de la réaction.

Comme témoin, nous avons utilisé pour chaque expérience une suspension de *resting bacteria* (1 ml de suspension bactérienne, 1 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7 et 1 ml d'eau bidistillée).

La consommation de l'oxygène moléculaire a été appréciée par la lecture du dénivèlement survenu toutes les vingt minutes, pendant deux heures, en calculant ensuite l'oxygène consommé à l'aide de la formule de Barcroft-Warburg.

Pour exprimer les résultats, nous nous sommes servis du rapport entre la quantité d'oxygène moléculaire consommée par la suspension bactérienne (équivalente à 1 mg de corps microbiens desséchés) mise en contact avec l'un des métabolites étudiés (*épreuve*), et la quantité d'oxygène moléculaire consommée par la même suspension bactérienne en l'absence de ce dernier (*témoin*) :

$$\frac{\text{Qo}_2 \text{ épreuve}}{\text{Qo}_2 \text{ témoin}} = \frac{\text{cm}^3 \text{ O}_2 \text{ consommé en deux heures par l'épreuve}}{\text{cm}^3 \text{ O}_2 \text{ consommé en deux heures par le témoin}}$$

Au cas où ce rapport est plus grand que 1, l'augmentation de la consommation d'oxygène témoigne la métabolisation active de la substance ajoutée à l'expérience. Inversement, les valeurs inférieures à 1 indiquent un effet inhibiteur du métabolite ajouté vis-à-vis du processus global d'oxydo-réduction.

Dans l'exposé des résultats, nous appellerons ce rapport « indice d'activité oxydative », les valeurs enregistrées représentant la moyenne de 2 à 4 lectures effectuées.

4° Pour déterminer les processus de transformation du pyruvate en acétate, nous avons tenu compte du fait que ceux-ci peuvent être réalisés [6] :

a) Soit par l'intermédiaire de l' α -cétocarboxylase, avec production d'acétaldéhyde et du CO_2 ;

b) Soit par l'intermédiaire de la déshydrogénase pyruvique (en présence des ions magnésium, du thiaminepyrophosphate, du diphosphopyridinenucléotide, du coenzyme A et de l'acide lipoïque), avec production d'acide acétique (sous forme d'acétyl-coenzyme A) et de CO_2 .

Dans ce dernier cas, il y a oxydation concomitante, en ce sens que, pour chaque molécule de pyruvate transformée, une molécule d'oxygène est consommée et une molécule de CO_2 est libérée.

En tenant compte de ces faits pour l'étude du processus de décarboxylation oxydative du pyruvate chez les souches de *Mycobacterium*

étudiées, nous avons utilisé comme système de réaction le mélange suivant :

1 ml de pyruvate de sodium 0,1 M en tampon phosphate 0,2 M (avec 10^{-3} Mg⁺⁺ et pH à diverses valeurs),
1 ml de suspension bactérienne,
0,1 ml de solution aqueuse 5 p. 100 de bleu de méthylène,
0,2 ml de solution aqueuse 1 p. 100 de KCN,
0,7 ml d'eau bidistillée (ou solution aqueuse des substances dont on étudiait l'action sur le processus de décarboxylation).

Ce mélange est introduit dans le récipient de l'appareil de Warburg. Pour chaque épreuve, nous avons utilisé deux récipients semblables à cette différence près que l'un contenait dans la cupule centrale 0,25 ml KOH 20 p. 100, l'autre 0,25 ml d'eau distillée. Le récipient contenant le KOH permettait d'évaluer l'oxygène consommé (le CO₂ libéré pendant la réaction étant capté par le KOH) ; le récipient contenant l'eau distillée permettait d'évaluer le CO₂ libéré, à condition de faire la correction volumétrique de l'O₂ consommé.

Pour l'expression des résultats, nous nous sommes servis du symbole Qo₂ pour la quantité (en millimètres cubes) d'oxygène moléculaire consommé en cent minutes par 1 mg de suspension de corps bactériens desséchés. De même, nous avons noté par Qco₂ la quantité (en millimètres cubes) de CO₂ libéré en cent minutes par 1 mg de corps bactériens desséchés.

Quand le rapport Qo₂/Qco₂ est égal à 1, il indique une décarboxylation par voie oxydative ; quand il est inférieur à 1, la décarboxylation du pyruvate a eu lieu, aussi bien avec oxydation concomitante que par voie directe, sans consommation d'oxygène moléculaire.

MÉTABOLISATION DES CONSTITUANTS DU CYCLE DES ACIDES TRICARBOXYLIQUES.

Le système des acides tricarboxyliques joue, dans la cellule, un double rôle fonctionnel : énergétique et de synthèse. Dans les processus de synthèse, le cycle citrique fait la liaison entre les trois catégories métaboliques de base (glucidique, protidique et lipidique), assurant entre eux la transformation des composants élémentaires, tels que : produits ternaires de dégradation glucidique, aminoacides précurseurs des substances azotées, et constituants dicarboniques, précurseurs des lipides. Du point de vue énergétique, le cycle de Krebs constitue un système catalytique de base, qui assure directement ou par l'intermédiaire des processus de phosphorylation oxydative, la formation des unités biochimiques macroergiques. Le déroulement des processus énergétiques est lié à la présence d'oxygène moléculaire, étant de type oxybiotique, tandis que la fonction synthétique du cycle des acides tricarboxyliques se déroule de préférence en anoxybiose. Dans ce dernier cas, l'énergie libérée disponible est plus réduite, étant

donné que les déshydrogénations s'effectuent soit par libération d'hydrogène moléculaire, soit par acceptation de l'atome d'hydrogène par un certain métabolite, à un niveau d'oxydo-réduction inférieur à celui de l'oxygène moléculaire.

Le cycle des acides tricarboxyliques chez le bacille tuberculeux a été fréquemment étudié ces dernières années [9, 13, 17, 18]. Ces recherches, effectuées presque exclusivement en oxybiose, ont prouvé que les cellules des Mycobactéries manifestent une augmentation de leur activité respiratoire en présence de tous les constituants du cycle de Krebs, à l'exception du citrate, qui n'est pas utilisé par toutes les souches, mais qui, pourtant, est produit par celles-ci [2]. En même temps, il a été constaté que les extraits des mitochondries du bacille tuberculeux contiennent tous les enzymes du cycle des acides tricarboxyliques, ce qui permet d'isoler des extraits bacillaires l'enzyme de condensation, les déshydrogénases malique et succinique, l'aconitase, la fumarase et la décarboxylase oxalo-acétique.

Au cours de nos recherches [21] nous avons étudié le potentiel de métabolisation des constituants du cycle de Krebs par les Myco-

TABLEAU I.

		Pyruvate.	Citrate.	Cétoglutarate.	Succinate	Fumarate	Malate	Oxalo-acétate
H37 Rv	sans INH	1,54	1,12	1,20	1,21	1,13	1,00	1,28
	avec INH	1,30	0,83	0,98	1,13	1,00	0,95	1,32
H37 Ra	sans INH	1,28	1,00	1,18	1,08	1,33	0,88	1,11
	avec INH	0,96	0,70	0,92	1,00	0,97	0,76	1,10
H37 Rv R 20µg INH	sans INH	1,75	0,97	1,00	1,10	1,15	0,97	1,19
	avec INH	1,67	0,80	0,98	1,11	1,10	1,00	1,18
BCG	sans INH	1,50	1,00	1,00	1,24	2,02	1,00	1,12
	avec INH	1,25	0,80	0,89	1,22	1,86	0,90	1,13
BCG R 100µg INH	sans INH	1,68	1,01	1,05	1,09	1,23	1,09	1,19
	avec INH	1,67	0,93	1,05	1,10	1,11	1,09	1,31
<i>M phlei</i>	sans INH	1,46	1,16	1,52	1,14	1,12	1,59	1,00
	avec INH	1,48	1,17	1,53	1,12	1,03	1,23	1,01
<i>M smegmatis</i>	sans INH	1,45	1,22	2,18	1,13	1,89	2,27	1,02
	avec INH	1,38	1,16	2,13	1,12	1,91	2,16	0,99

bactéries, tant en oxybiose, qu'en anoxybiose. Dans les deux cas nous avons étudié, en outre, l'influence de l'INH, afin de déceler l'action spécifique de cet agent thérapeutique sur les différentes étapes du cycle de Krebs.

Les résultats des recherches effectuées en oxybiose, exprimés sous forme d'indice d'activité oxydative, sont exposés dans le tableau I.

Ainsi qu'il ressort de ce tableau, il existe certaines différences quantitatives et qualitatives entre le potentiel oxydatif des diverses souches étudiées :

a) La souche virulente H37Rv, qui métabolise tous les constituants du cycle de Krebs, manifeste un potentiel oxydatif plus intense que les variantes atténuées ou avirulentes des bacilles tuberculeux. Les bacilles paratuberculeux, de même, manifestent une activité oxydative très marquée, et qui, dans le cas de l' α -cétoglutarate et du malate, dépasse même sensiblement celle de la souche H37Rv.

b) Les souches à virulence atténuée (BCG, les variantes INH-résistantes et la souche H37Ra) ne sont pas capables d'oxyder le citrate en aérobiose.

c) Le cétoglutarate est oxydé par la souche H37Rv, ainsi que par sa variante avirulente H37Ra et par les bacilles paratuberculeux, tandis que les variantes INH-résistantes et le BCG n'augmentent pas leur consommation d'oxygène en présence de cette substance.

d) L'oxalo-acétate n'est pas utilisé, dans des conditions d'oxybiose, par les bacilles paratuberculeux étudiés.

e) L'isoniazide (à la concentration de 700-800 $\mu\text{g/ml}$ pour 1 mg de corps bactériens desséchés) a une action inhibitrice sur la métabolisation du pyruvate, du citrate, du cétoglutarate et du fumarate, par les souches INH-sensibles. En revanche, l'oxydation du malate, du succinate et particulièrement de l'oxaloacétate n'est pas inhibée par la présence de l'INH.

L'oxydation des constituants du cycle de Krebs par les bacilles à résistance naturelle ou acquise ne paraît pas être affectée par la présence de l'INH dans le milieu, à l'exception du citrate, pour lequel nous avons obtenu des valeurs de l'indice d'activité oxydative inférieures à 1.

L'abaissement de la valeur de cet indice en présence d'INH peut être attribuée, dans le cas du pyruvate, à une action directe entre l'INH et le pyruvate [20], aboutissant à la formation d'un composé complexe, qui est métabolisé à un rythme plus lent.

En anoxybiose, l'indice d'activité oxydative en présence des constituants du cycle des acides tricarboxyliques a en général des valeurs plus grandes, étant supérieure à 1 pour toutes les souches étudiées (tableau II).

Comme en oxybiose, les bacilles paratuberculeux manifestent en anoxybiose une activité de déshydrogénation, vis-à-vis du cétoglutarate, du fumarate et du malate, plus intense que les bacilles tuberculeux. L'oxalo-acétate est faiblement utilisé par les paratuberculeux, tant en oxy- qu'en anoxybiose. En revanche, le succinate est intensément déshydrogéné en anoxybiose.

Parmi les bacilles tuberculeux, la souche la plus virulente est celle qui manifeste l'activité oxydative la plus marquée.

La présence d'INH dans le milieu exerce, en anoxybiose, une action inhibitrice de tous les processus oxydatifs des souches INH-

TABLEAU II.

		Pyruvate	Citrate	Cétogluta- rate	Succinate	Fumarate	Malate	Oxalo- acétate
H37Rv	sans INH	2,40	2,64	1,84	1,51	2,88	2,07	2,19
	avec INH	1,87	2,32	1,65	1,43	2,45	1,10	1,53
H37Ra	sans INH	2,26	1,41	1,66	2,01	1,68	1,50	1,60
	avec INH	1,75	1,50	1,36	1,72	1,35	1,58	1,53
H37Rv R 20 µg INH	sans INH	2,33	1,78	1,74	1,81	1,75	1,80	2,09
	avec INH	2,13	1,74	1,49	1,70	1,56	1,83	1,92
BCG	sans INH	2,2	1,58	1,56	1,61	2,19	1,36	1,50
	avec INH	1,78	1,23	1,22	1,52	1,79	1,18	1,19
BCG R 100 µg INH	sans INH	2,00	1,42	2,25	1,43	2,07	1,96	1,80
	avec INH	1,85	1,37	1,90	1,38	1,81	1,92	1,71
<i>M. phlei</i>	sans INH	1,62	1,50	3,00	2,64	2,98	2,35	1,15
	avec INH	1,59	1,48	2,95	2,32	2,65	2,35	1,10
<i>M. smegmatis</i>	sans INH	1,56	1,23	2,00	2,24	2,76	2,18	1,12
	avec INH	1,48	,25	1,93	2,09	2,51	2,12	0,97

sensibles, à l'exception de la variante avirulente H37Ra qui, de ce point de vue, se comporte comme les saprophytes paratuberculeux, manifestant une résistance vis-à-vis de l'action de l'INH. en ce qui concerne la déshydrogénisation du citrate, du malate et de l'oxaloacétate.

Quant à l'oxydation du cétoglutarate, les paratuberculeux ne sont pas inhibés par la présence d'INH, tandis que H37Ra est inhibé.

En anoxybiose, la présence d'INH diminue le potentiel oxydatif des variantes à INH-résistance acquise. Cet effet s'exerce sur la métabolisation du pyruvate, du cétoglutarate, du fumarate et de l'oxalo-acétate, mais reste sans effet sur l'utilisation du malate, qui est, elle aussi, inhibée par la présence d'INH lorsqu'il s'agit des bacilles INH-sensibles.

Effet combiné du coenzyme I (DPN) et de l'isoniazide [24].

Un grand nombre des processus d'oxydation, en anoxybiose, sont généralement catalysés par des déshydrogénases dont le coenzyme est représenté par le diphosphopyridine-nucléotide. Utilisant les extraits cellulaires de bacilles tuberculeux, Holmgren, Millman et Youmans [13] ont constaté que les DPN, TPN et ATP ont un effet activant sur la transformation du fumarate, du malate, du succinate, du citrate, de l'oxalo-acétate et du cétoglutarate.

Dans nos conditions d'expérience, l'utilisation combinée du coenzyme I et de l'isoniazide nous a permis de mettre en évidence certaines différences dans les processus de métabolisation des constituants du cycle de Krebs par les souches de *Mycobacterium* étudiées. Ainsi :

a) La métabolisation en anoxybiose du pyruvate, du fumarate et du malate est activée pour toutes les souches étudiées par le DPN. L'addition de l'INH au système de réaction a pour effet la réduction du rythme de métabolisation de ces substances par les souches INH-sensibles (H37Rv, H37Ra et BCG), en présence ou en l'absence du DPN dans le milieu.

b) La métabolisation du lactate est influencée par la présence du DPN dans le cas seulement de la souche H37Rv, de sa variante avirulente H37Ra et des paratuberculeux (*M. phlei* et *M. smegmatis*). En présence d'INH, la souche INH-sensible et virulente (H37Rv) est la seule dont le rythme de déshydrogénation du lactate est réduit, et cela en présence ou en l'absence du DPN. A ce point de vue, la variante avirulente H37Ra se comporte de la même manière que les paratuberculeux.

c) Le DPN exerce une action activante sur la métabolisation du succinate par les souches de *M. tuberculosis*, tandis que les paratuberculeux ne subissent pas l'influence du DPN. Dans ce cas aussi, le coenzyme I ne peut pas neutraliser l'effet inhibiteur que l'INH exerce sur les souches INH-sensibles.

Les travaux de Kerppola et Päätiälä [14], qui ont constaté une diminution des pyridine-nucléotides dans le sang des animaux tuberculeux et le retour à une concentration normale de ces substances à la suite de l'administration d'INH, pourraient suggérer la possibilité d'une action inhibitrice de cette dernière sur les réactions enzymatiques intéressant les pyridine-nucléotides.

Cependant, Goldman [8], reprenant ses recherches, n'a pas constaté d'effet inhibiteur direct de l'INH (ou de ses analogues) sur la réduction des phosphopyridine-nucléotides par les déshydrogénases spécifiques. De même les résultats de nos expériences prouvent que l'effet inhibiteur de l'INH, sur les processus enzymatiques activés par le DPN, ne peut pas être attribué à une interaction entre l'INH et le DPN, le coenzyme I ne pouvant pas neutraliser l'effet de l'INH. Ceci résulte, entre autres, du fait que l'INH n'exerce une action inhibitrice que dans le cas des bactéries INH-sensibles, tandis que chez les variantes INH-résistantes, des processus similaires, activés par le DPN, ne sont pas influencés par l'INH.

MÉTABOLISATION DE L'ACÉTATE ET DE SES PRÉCURSEURS.

L'acétate et ses dérivés directs, l'acétyl-phosphate et l'acétyl-coenzyme A, occupent une situation particulière dans le métabolisme intermédiaire. En sa qualité d'unité dicarbonique, l'acétate constitue le matériel primaire pour la synthèse des lipides et, grâce à l'enzyme de condensation, il est impliqué directement dans les fonctions du cycle des acides tricarboxyliques et, par cela même, dans le métabolisme énergétique et synthétique de base de la cellule.

Le rôle de l'acétate comme source de carbone pour le genre *Mycobacterium* est bien connu [49].

Récemment encore, Long et coll. [46] ont constaté, à l'aide des isotopes radioactifs, que les bacilles tuberculeux utilisent intensément et rapidement, comme source de carbone, l'acétate ajouté au milieu de culture. Le rôle de l'acétate, dans les processus énergétiques et synthétiques des Mycobactéries a été signalé par de nombreux auteurs. Récemment, Goldman [9] a préparé, à partir des extraits cellulaires de la souche H37Rv, un enzyme de condensation partiellement purifié, ce qui prouve même pour le bacille tuberculeux la participation de l'acétate au cycle des acides tricarboxyliques.

Il ressort de tous ces faits que la connaissance des éventuelles différences existant entre les souches virulentes et atténuées, en ce

TABLEAU III.

Souches	Oxybiose		Anoxybiose	
	En absence d'INH	En présence d'INH	En absence d'INH	En présence d'INH
H 37 Rv	1,73	1,36	2,35	2,00
H 37 Ra	1,59	1,32	1,72	,28
H 37 Rv R 20 µg INH	1,44	1,45	2,67	2,50
BCG	,50	1,05	2,00	1,71
BCG R 100 µg INH	1,67	1,74	1,70	1,67
<i>M phlei</i>	,47	1,49	1,29	1,27
<i>M smegmatis</i>	1,45	1,44	1,60	1,54

qui concerne le métabolisme de l'acétate et de ses précurseurs est importante, pouvant fournir des indications sur les processus énergétiques et synthétiques.

En ce qui concerne la métabolisation de l'acétate, nos recherches [23], effectuées par la technique expérimentale déjà décrite,

nous ont fourni les résultats rapportés dans le tableau III en ce qui concerne les valeurs de l'indice d'activité oxydative des différentes souches étudiées.

Ainsi qu'on peut le voir, toutes les souches étudiées utilisent intensément l'acétate, tant en oxybiose, que, surtout, en anoxybiose. En oxybiose c'est la souche virulente H37Rv qui manifeste le rythme d'oxydation de l'acétate le plus marqué, tandis que sa variante isoniazido-résistante atténuée (H37Rv R 20 µg INH) le métabolise avec une intensité réduite, semblable à celle des souches naturellement résistantes (*M. phlei* et *M. smegmatis*). En revanche, en anoxybiose, tandis que l'utilisation de l'acétate par la variante isoniazido-résistante est augmentée, dépassant même en intensité la souche d'origine, les bacilles paratuberculeux ne manifestent pas une augmentation semblable.

La présence de l'INH a une action inhibitrice sur l'utilisation de l'acétate, spécialement en conditions d'oxybiose, dans le cas de toutes les souches INH-sensibles, et cela indépendamment de leur degré de virulence. Les bacilles naturellement résistants, ou bien à résistance acquise, ne sont pas influencés par la présence de l'INH au cours de la métabolisation de cette substance.

Ces résultats prouvent qu'il existe certaines différences entre les bacilles virulents et atténués ou avirulents en ce qui concerne l'utilisation de l'acétate. Ces différences sont particulièrement évidentes entre les souches INH-sensibles et leurs variantes INH-résistantes, parce que le processus est inhibé par l'INH dans le cas seulement des bacilles de la première catégorie.

LES PRÉCURSEURS DE L'ACÉTATE.

Le pyruvate et le lactate représentent, au cours du métabolisme intermédiaire, les sources habituelles de l'acétate.

En ce qui concerne le pyruvate, ainsi nous l'avons déjà dit, il est intensément utilisé par toutes les souches étudiées, spécialement en anoxybiose, la différence entre les souches sensibles et résistantes pouvant être mise en évidence par addition de l'INH au système de réaction.

Le lactate est utilisé avec une particulière intensité en oxybiose, spécialement par les souches à virulence atténuée. Les variantes INH-résistantes sont caractérisées par une consommation très intense de l'oxygène en oxybiose en présence du lactate, ainsi que par l'absence de l'influence de l'INH. Les souches INH-sensibles, quel que soit leur degré de virulence, sont toutes inhibées par l'INH quant à la métabolisation du lactate, et cela surtout en conditions d'oxybiose.

Il en résulte donc que le mécanisme d'utilisation du lactate par les bacilles tuberculeux est modifié avec l'acquisition de la résistance à l'INH.

Mais, en dehors du pyruvate et du lactate, il existe encore d'autres précurseurs potentiels de l'acétate.

Ainsi, pour certains genres bactériens comme *Aerobacter*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*, Krebs [15] a signalé que la fermentation du citrate produit de l'oxalo-acétate et du pyruvate. En ce qui concerne la métabolisation du citrate par les souches de *Mycobacterium*, il a été dit que ce métabolite n'est que très peu utilisé en oxybiose et seulement par la souche virulente et INH-sensible H37Rv, tandis qu'en anoxybiose il est métabolisé par toutes les souches de bacilles tuberculeux. Dans ce cas, la présence de l'INH ne permet pas de mettre en évidence des différences concernant ce métabolisme.

D'autre part, Coon et coll. [4] ont démontré que la dégradation de la leucine et de l'isoleucine aboutit à la formation des fractions dicarboniques actives : acéto-acétate et acétyl-coenzyme A, ce qui permettrait d'englober ces substances parmi les précurseurs de l'acétate.

Nos recherches concernant la métabolisation de ces deux substances par les souches de *Mycobacterium* étudiées ont montré que, en condition d'oxybiose, la leucine et l'isoleucine sont métabolisées seulement par les souches H37Rv et BCG. Les variantes INH-résistantes, la souche avirulente H37Ra et les paratuberculeux ne peuvent utiliser ces amino-acides qu'en anoxybiose. La présence de l'INH, spécialement en anoxybiose, a une action inhibitrice sur le processus de catabolisation de la leucine et de l'isoleucine, dans le cas seulement des souches INH-sensibles. Il en résulte donc que, tandis qu'en oxybiose les variantes INH-résistantes n'utilisent pas du tout ces substances, elles les utilisent en anoxybiose, mais le mécanisme d'utilisation est différent de celui des souches sensibles d'origine.

LA DÉCARBOXYLATION DU PYRUVATE.

Nous avons aussi étudié [26] le processus de décarboxylation du pyruvate sur les souches de *M. tuberculosis* résistantes à la streptomycine (H37Rv R 1 000 µg streptomycine et BCG R 1 000 µg streptomycine). Nous avons recherché : a) l'influence du pH sur le processus de décarboxylation ; b) l'effet de certains constituants qui prennent part au processus de décarboxylation ; c) l'effet de l'INH, de la streptomycine et de la pénicilline.

a) *Influence du pH.* Le processus de décarboxylation du pyruvate par les souches de *Mycobacterium* étudiées subit des varia-

tions quantitatives et qualitatives en fonction du pH du milieu (tampon phosphate 0,2 M avec 10^{-3} Mg⁺⁺).

Nous avons trouvé, pour le rapport Q_{O_2}/Q_{CO_2} , les valeurs rapportées dans le tableau IV.

En valeurs absolues nous avons constaté [26] que l'intensité de

TABLEAU IV.

	pH 4,7	pH 5,4	pH 5,8	pH 6,5	pH 7,0
H37Rv	36 / 42 = 0,85	44 / 52 = 0,84	51 / 63 = 0,81	54 / 68 = 0,80	65 / 93 = 0,70
H37Rv R 20µg INH	15 / 15,3 = 0,98	19 / 20,5 = 0,92	46 / 50 = 0,92	51 / 57 = 0,89	53 / 62 = 0,85
H37Rv R1000µg streptomycine	10 / 10,4 = 0,96	19 / 18 = 1,07	11,5 / 11 = 1,04	23 / 23 = 1,00	20 / 20,5 = 0,97
BCG	26 / 34,5 = 0,75	39 / 53 = 0,73	40 / 59 = 0,68	50 / 71 = 0,70	80,5 / 111 = 0,72
BCG R100µg INH	19,2 / 22,9 = 0,83	22,3 / 30,5 = 0,73	24,7 / 28,7 = 0,84	24,2 / 31,6 = 0,76	28 / 37,2 = 0,75
BCG R1000µg streptomycine	6,7 / 6,2 = 1,08	11,3 / 11,8 = 0,96	18 / 20 = 0,90	22,8 / 28,6 = 0,88	43,5 / 50 = 0,87

la décarboxylation croît à mesure que le pH approche de la neutralité. Le maximum d'activité paraît se situer entre pH 6,5-7,0.

L'intensification de la décarboxylation à mesure du déplacement du pH vers la neutralité intéressant les processus oxydatifs directs et indirects, il ressort du rapport Q_{O_2}/Q_{CO_2} que, par ce changement de pH, l'activité de la cétocarboxylase est plus intensément stimulée que l'activité de la déshydrogénase pyruvique. Pour des valeurs moindres du pH (4,7-5,4) l'activité de l' α -cétocarboxylase est très réduite.

Chez les souches sensibles aux bactériostatiques (H37Rv et BCG), la décarboxylase du pyruvate est plus intense que chez les souches résistantes à l'INH ou à la streptomycine. Il y a aussi des différences, tant pour les souches sensibles que pour les souches résistantes, en ce qui concerne l'intensité du processus de décarboxylation. Ainsi, la souche sensible et virulente H37Rv est plus active que la souche sensible mais atténuée BCG, et que les souches INH-résistantes ; à leur tour, ces dernières sont plus actives que les souches streptomycino-résistantes.

Il faut encore souligner le fait que, tandis que pour toutes les autres souches la valeur du rapport Q_{O_2}/Q_{CO_2} s'abaisse à mesure que le pH s'élève, pour les variantes streptomycino-résistantes ce rapport reste égal à l'unité, quelles que soient les variations du pH. Ceci prouve que les modifications métaboliques survenues avec l'acquisition de la streptomycino-résistance aboutissent à l'utilisation presque exclusive de la voie de décarboxylation oxydative du pyruvate.

b) *Influence des co-facteurs de la décarboxylation oxydative.* Parmi les différents éléments qui prennent part au processus de décarboxylation oxydative, nous avons étudié l'action des ions Mg^{++} (à la concentration de 10^{-3} - 10^{-4}), du diphosphopyridine nucléotide (10^{-4}) et du thiaminephosphate (10^{-4}).

Les résultats obtenus montrent que, dans le cas de toutes les souches étudiées, la vitesse de décarboxylation du pyruvate s'accroît en présence de ces substances. Cette activité, en général réduite (6-9 p. 100), augmente jusqu'à deux fois quand la suspension bactérienne est soumise à l'action de ces trois facteurs.

De plus, nous avons constaté que la présence de ces substances exerce une influence tant sur la déshydrogénase pyruvique que sur la cétocarboxylase, le rapport entre l'oxygène consommé et le CO_2 libéré se maintenant à des valeurs inférieures à 1.

c) *Influence des antibiotiques (INH, 100 $\mu g/ml$; streptomycine, 100 g/ml ; pénicilline, 10 000 U.I./ml).* Nous avons étudié l'action de ces divers antibiotiques sur le processus de décarboxylation des souches de *Mycobacterium* ainsi que sur le staphy-

TABLEAU V.

Souche	Isoniazide		Streptomycine		Pénicilline	
	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}	Q_{O_2}	Q_{CO_2}
H 37 Rv	112,5	116	83	87,5	63	86
H 37 Ra	129	123	79,5	89	88	93
H 37 Rv. R20 μg INH	98,5	111,5	76	81	71	80,5
H 37 Rv. R100 μg streptom.	111	110,5	89	91,5	76	79
BCG	106	119	81	86	80	91
BCG R100 μg INH	97,5	120	82	82	72	82
BCG R1000 μg streptom.	109	113	88,5	89,5	69,5	76
<i>M. phlei</i>	96	137	86	83	76	92
<i>M. smegmatis</i>	94	129,5	91	96,5	73	93
<i>S. aureus</i> Oxford	123	163	93	111	98	101
<i>E. coli</i> "7"	101	108	92,5	99	91,5	92,5

locoque doré Oxford et la souche 7 d'*Escherichia coli*.

Les résultats, exprimés en pourcentages, par rapport à la suspension témoin, sans antibiotiques, sont rapportés dans le tableau V.

Ainsi qu'on peut le voir, alors que la streptomycine et la pénicilline ont une action inhibitrice globale sur le processus de décarboxylation du pyruvate pour toutes les souches étudiées, l'isoniazide a une action stimulante, elle aussi globale, sur la décarboxylation pour toutes les souches INH-sensibles, tandis que,

dans le cas des souches INH-résistantes, il stimule seulement la libération du CO_2 (α -cétocarboxylase pyruvique).

Dans le cas du staphylocoque doré Oxford, l'INH a une action activante, tant sur la décarboxylation simple qu'oxydative. *Escherichia coli*, bactérie Gram négative, ne semble pas être particulièrement influencée par la présence de l'isoniazide pour ce qui concerne la transformation du pyruvate en acétate.

Ces modalités diverses de l'action des trois substances antimicrobiennes suggèrent l'existence de modes d'action différents. Ainsi, le fait que la pénicilline et la streptomycine exercent un effet inhibiteur global sur le processus de décarboxylation laisserait supposer qu'il s'agit d'une action de réduction de la perméabilité de la membrane cellulaire pour le pyruvate semblable à celle qui a été constatée pour l'action de ces mêmes bactériostatiques vis-à-vis d'autres substances [7]. Par contre, l'isoniazide paraît exercer une action directe sur le processus de décarboxylation, étant donné qu'il n'est pas actif vis-à-vis d'une bactérie Gram-négative comme *Escherichia coli* ; de même, lorsqu'il s'agit des souches INH-résistantes de *Mycobacterium*, son action activante ne s'exerce que sur la décarboxylation directe, et pas du tout (elle peut même être inhibitrice) sur le processus de décarboxylation oxydative.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

De l'étude des modifications du métabolisme chez les souches de *Mycobacterium* étudiées il résulte que :

1° La souche virulente H37Rv possède un potentiel oxydatif très intense, particulièrement en oxybiose. Parmi les précurseurs de l'acétate, elle utilise le pyruvate, le lactate, le citrate, la leucine et l'isoleucine. Elle provoque une décarboxylation intense du pyruvate et ce, tant par déshydrogénation que par l'intermédiaire de la cétocarboxylase.

Elle diffère en ceci de sa variante streptomycino-résistante, qui utilise de préférence la décarboxylation oxydative, étant aussi douée d'une vitesse métabolique moindre.

L'INH exerce une action inhibitrice sur la métabolisation, par la souche H37Rv, du pyruvate, du citrate, du cétoglutarate, du fumarate, de l'acétate, du lactate, de la leucine et de l'isoleucine. La décarboxylation du pyruvate est globalement stimulée par l'INH, mais est inhibée par la streptomycine et la pénicilline.

Le coenzyme I n'a pas d'effet neutralisant sur l'action de l'INH.

2° La souche atténuée BCG et la variante avirulente H37Ra manifestent la même sensibilité des processus métaboliques, vis-

à-vis de l'INH, que la souche virulente. En ce qui concerne le rythme des processus oxydatifs, ces deux souches sont moins actives que la souche H37Rv. D'autre part, les souches BCG et H37Ra manifestent certaines déficiences métaboliques, telles que l'incapacité d'utiliser en oxybiose le citrate, le cétoglutarate et le malate, éléments constituant du cycle de Krebs. Dans les mêmes conditions, la variante H37Ra ne peut utiliser ni la leucine ni l'isoleucine.

3° Les souches isoniazido-résistantes à virulence atténuée présentent des déficiences métaboliques semblables à celles des autres *Mycobactéries* atténuées ; incapacité de métaboliser en oxybiose le citrate, le cétoglutarate et le malate, et, parmi les précurseurs de l'acétate, la leucine et l'isoleucine. Le métabolisme oxydatif de ces variantes se déroule, de même que celui des autres souches à virulence atténuée, à un rythme plus lent en oxybiose, mais, différant en cela des souches isoniazido-sensibles, leur mécanisme oxydatif n'est pas influencé par la présence de l'INH. Chez les variantes isoniazido-résistantes, l'INH stimule seulement l'activité de la cétocarboxylase, au cours du processus de décarboxylation.

4° Les *Mycobactéries* saprophytes (*M. smegmatis* et *M. phlei*) ont un métabolisme différent. Ainsi, en oxybiose elles n'utilisent pas l'oxalo-acétate, la leucine et l'isoleucine ; en échange elles métabolisent le citrate, le cétoglutarate et le malate. Le métabolisme oxydatif des paratuberculeux n'est pas influencé par la présence de l'INH, ce qui d'ailleurs est en concordance avec l'isoniazido-résistance de ces souches.

De l'ensemble de nos recherches, nous pouvons conclure qu'il existe, entre les souches virulentes de *Mycobacterium* et les souches à virulence atténuée, d'importantes différences métaboliques quantitatives et qualitatives, intéressant aussi bien les processus énergétiques (cycle de Krebs) que les processus synthétiques. En ce qui concerne ces derniers, les modifications du métabolisme de l'acétate et de ses précurseurs, suggèrent l'existence de modifications correspondantes dans la synthèse des lipides, constituants cellulaires qui sont des facteurs du pouvoir pathogène des bacilles. Dans cet ordre d'idées, nos recherches antérieures [22] ont montré que certains lipides (fraction acétonosoluble) des souches à virulence atténuée (BCG et variantes isoniazido-résistantes) manifestent un pouvoir cytotoxique réduit par comparaison aux mêmes lipides provenant des souches virulentes.

Pour ce qui est de l'acquisition de l'isoniazido-résistance, celle-ci entraîne des modifications multiples et complexes de la cellule bactérienne, allant de pair avec l'atténuation de la viru-

lence. Ceci est d'autant plus évident que des recherches récentes [25] nous ont permis de constater que, chez les bacilles isoniazido-résistants, la teneur en acide ribonucléique est diminuée d'environ 25 p. 100, la teneur en acide désoxyribonucléique se maintenant au même niveau que celui des bacilles virulents. Une telle modification, importante étant donné le rôle de l'acide ribonucléique comme « organisateur » des processus métaboliques, doit certainement correspondre à des transformations complexes dans la structure et la réactivité de la cellule, ce qui d'ailleurs se traduit par les changements importants du métabolisme, de la constitution chimique et du pouvoir pathogène, que nos recherches ont mis en évidence.

RÉSUMÉ.

Les auteurs ont étudié sept souches de *Mycobacterium* (H37Rv INH-sensible et INH-résistant, H37Ra, BCG INH-sensible et INH-résistant, *M. phlei* et *M. smegmatis*) du point de vue de leur potentiel de métabolisation en oxybiose et en anoxybiose, des constituants du cycle de Krebs, de l'acétate et de ses précurseurs, ainsi que du processus de décarboxylation du pyruvate.

1° La souche virulente H37Rv métabolise intensément, surtout en oxybiose, tous les constituants du cycle de Krebs, ainsi que l'acétate et ses précurseurs. L'INH a une action inhibitrice sur le métabolisme du citrate, du cétoglutarate, du fumarate, de l'acétate, du lactate, de la leucine et de l'isoleucine, mais reste sans effet sur le métabolisme du malate, de l'oxalo-acétate et du succinate. Le coenzyme I ne neutralise pas l'effet de l'INH.

2° La souche atténuée BCG et la variante avirulente H37Ra sont également sensibles à l'action de l'INH, mais le rythme de leurs processus oxydatifs est moins actif que celui de la souche virulente H37Rv. D'autre part, les deux souches ne peuvent pas utiliser en oxybiose le citrate, le ceto-glutarate et le malate, la souche H37Ra, ne pouvant utiliser ni la leucine, ni l'isoleucine (précurseurs de l'acétate).

3° Les variantes INH-résistantes à virulence atténuée présentent des déficiences métaboliques semblables à celles des Mycobactéries atténuées (BCG et H37Ra), mais leurs processus oxydatifs ne sont pas inhibés par l'INH. De plus, tandis que l'INH stimule globalement la décarboxylation du pyruvate par les souches INH sensibles, dans le cas des souches résistantes l'activité de la cétocarboxylase est seule stimulée.

La streptomycine et la pénicilline inhibent le processus de décarboxylation de toutes les souches.

4° Le métabolisme des Mycobactéries saprophytes (*M. smegmatis* et *M. phlei*) est plus différent encore ; en oxybiose les deux souches n'utilisent ni l'oxalo-acétate, ni la leucine et l'isoleucine, mais elles métabolisent le citrate, le céto-glutarate et le malate. L'INH n'exerce pas d'action inhibitrice sur ces processus métaboliques, ce qui concorde avec l'INH-résistance de ces souches.

Il existe donc, entre les souches de *Mycobacterium* étudiées, des différences quantitatives et qualitatives intéressant les processus énergétiques et synthétiques.

Ces modifications complexes vont de pair, pour les variantes INH-résistantes, avec une teneur en acide ribonucléique plus réduite que celle des souches sensibles et virulentes.

D'autre part, les modifications dans le métabolisme de l'acétate et de ses précurseurs suggèrent l'existence de changements correspondants dans la synthèse des lipides, constituants doués d'un potentiel cytotoxique.

SUMMARY

METABOLIC ALTERATIONS AND PATHOGENICITY OF *Mycobacterium tuberculosis*.

Study of the metabolic capacity in aerobiosis and anaerobiosis, the constituents of Krebs' cycle, acetate and its precursors, and the pyruvate decarboxylation process, in seven strains of *M. tuberculosis*. (INH-sensitive and INH-resistant H37Rv, H37Ra, INH-sensitive and INH-resistant BCG, *M. phlei* and *M. smegmatis*).

1. The virulent H37Rv strain intensely metabolizes (particularly in aerobiosis) all the constituents of the Krebs' cycle, and acetate and its precursors. INH inhibits the metabolism of citrate, ceto-glutarate, fumarate, acetate, lactate, leucin and isoleucin, but has no action on malate, oxalo-acetate and succinate metabolism. Coenzyme I does not neutralize the effect of INH.

2. The attenuated BCG and the avirulent H37Ra strains are also sensitive to INH action, but the rhythm of their oxidative processes is slower than that of the virulent H37Rv strain. Moreover, both strains are unable to metabolize citrate, cetoglutarate and malate in aerobiosis, the H37Ra strain being also unable to take up leucin or isoleucin (acetate precursors).

3. The attenuated INH-resistant variants show metabolic deficiencies, similar to those of attenuated Mycobacteria (BCG and H37Ra), but their oxidative processes are not inhibited by INH. Moreover, whereas INH stimulates total pyruvate decarboxylation by INH-sensitive strains, the activity of the cetocarboxylase is only stimulated in the case of INH-resistant strains.

Streptomycin and penicillin inhibit decarboxylation processes in all the strains.

4. The metabolism of saprophytic *Mycobacteria* (*M. phlei*, *M. smegmatis*) is still more different. In aerobiosis both species do not metabolize oxalo-acetate, leucin or isoleucin, but they do metabolize citrate, ceto-glutarate and malate.

There exists therefore, between the species studied, quantitative and qualitative differences as to the energetic and synthetic processes.

In INH-resistant variants, these complex modifications accompany a ribonucleic acid level lower than that of sensitive and virulent strains.

On the other hand, the alterations in acetate and acetate precursors metabolism suggest the existence of corresponding alterations in the lipids synthesis, these constituents possessing a cytotoxic capacity.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ASSELINEAU (J.). *Progr. Explor. Tub.*, 1952, **5**, 1.
- [2] BLAKLEY (R. L.). *J. Bact.*, 1952, **64**, 609.
- [3] BLOCH (H.). *Progr. Explor. Tub.*, 1957, **9**, 47.
- [4] COON (M. J.), GURIN (S.), ABRAHAMSEN (N. S. B.) et GREENE (G. S.). *J. Biol. Chem.*, 1949, **180**, 1159 ; 1952, **195**, 805 et 1952, **199**, 75.
- [5] DUBOS (R. J.). *Biochemical determinants of microbiol. diseases*. Harvard University Press, Cambridge, Mass., 1954 ; in *Mechanismus of microbiol. pathogenicity*. Fifth Symp. Soc. gen. Microbiol., Cambridge University Press, 1955, 103.
- [6] ENGELHARDT (V. A.) et KANOPKATTE (S. I.). *Biochimiya* (Moscou), 1957, **22**, 21.
- [7] GALE (E. F.). *Adv. Enzymol.*, 1946, **6**, 1.
- [8] GOLDMAN (D. S.). *J. Bact.*, 1956, **72**, 401.
- [9] GOLDMAN (D. S.). *J. Bact.*, 1957, **73**, 602.
- [10] GUY (R.-L.), RAFFEL (S.) et CLIFTON (C. E.). *J. inf. Dis.*, 1954, **94**, 99.
- [11] HALPERN (B.). *Ph. D. Dissertation*, Northwestern University, Chicago, Illinois, 1957.
- [12] HELPAR (J. Q.), CLIFTON (C. E.), RAFFEL (S.) et FUTRELLE (C. M.). *J. inf. Dis.*, 1954, **94**, 90.
- [13] HOLMGREN (N. B.), MILLMAN (I.) et YOUNG (G. P.). *J. Bact.*, 1954, **66**, 405, 414 ; 1956, **69**, 320.
- [14] KERPPOLA (E.) et PATIALA (J.). *Ann. med. exper. biol. fenn.*, 1954, **27**, suppl. 7.
- [15] KREBS (H. A.), in *Chemical pathways of metabolism*. Academic Press, New York, 1954, **1**, 109.
- [16] LONG (E. B.), RITTENBERG (D.), KARNOVSKY (M. L.) et HENDERSON (H. J.). *Amer. Rev. Tub.*, 1955, **71**, 609.
- [17] McLAREN (L. C.) et JANN (G. J.). *Amer. Rev. Tub.*, 1955, **71**, 260.
- [18] MEADOW (P.) et KNOX (R.). *J. gen. Microbiol.*, 1956, **14**, 414.
- [19] MODEL (L. M.). *Biol. biochim. Tub. Mikobakt.*, Moscou, Acad. Med. Nauk SSSR, 1952.

- [20] NASTA (M.) et PAUNESCO (Eug.). *Probl. Terap.*, 1958, **8**, 51.
 - [21] NASTA (M.) et PAUNESCO (Eug.). *Studii Cercet. Inframicro.*, 1958, **9**, 471.
 - [22] NASTA (M.), PAUNESCO (E.) et GEORGESCO (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 272.
 - [23] NASTA (M.), PAUNESCO (Eug.) et GEORGESCO (P.). *Probl. Terap.*, 1959, **10**, 19.
 - [24] NASTA (M.), PAUNESCO (E.) et GEORGESCO (P.). *Studii Cercet. Bioch.*, 1958, **1**, 313.
 - [25] PAUNESCO (E.) et GEORGESCO (P.). *Probl. Terap.*, 1959, **10**, 131.
 - [26] PAUNESCO (E.). *Studii Cercet. Bioch.*, 1959, **2**, 299.
 - [27] SEVER (J. L.) et YOUNG (G. P.). *J. inf. Dis.*, 1957, **101**, 193.
 - [28] STAHELIN (H.), SUTER (S.) et KARNOVSKY (M.). *J. exp. Med.*, 1956, **104**, 137.
-

ÉTUDE DE LA DÉGRADATION DE LA SÉRUMALBUMINE HUMAINE PAR UN EXTRAIT DE RATE DE LAPIN

VII. — ISOLEMENT ET PROPRIÉTÉS D'UN FRAGMENT D'ALBUMINE

par Cl. LAPRESLE (*) et T. WEBB (**) (***).

(*Service de Chimie Microbienne, Institut Pasteur, Paris*)

Au cours de la dégradation de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin, il se forme des produits qui ne précipitent pas avec le sérum de lapin anti-albumine humaine mais qui inhibent la précipitation de ce sérum par l'albumine humaine [1]. Nous avons isolé l'un de ces produits de dégradation et étudié ses propriétés physiques et immunologiques. Dans ce travail, ce produit est désigné sous le nom d'inhibiteur.

MATÉRIEL.

1° PROTÉASE PURIFIÉE DE LA RATE DE LAPIN. — La protéase purifiée a été préparée à partir d'un extrait aqueux de rate de lapin comme précédemment [2]. L'activité protéolytique a été déterminée en utilisant comme substrat la sérumalbumine humaine et est exprimée en unités protéolytiques arbitraires (U. P.). comme précédemment [2].

2° SÉRUMALBUMINE HUMAINE (S. A. H.). — Fraction V (Squibb) préparée par précipitation par l'éthanol gracieusement fournie par l'American Red Cross.

3° SÉRUMALBUMINE HUMAINE DÉGRADÉE. — Des échantillons de sérumalbumine humaine dégradée ont été préparés avec la protéase purifiée de l'extrait de rate de lapin dans les conditions suivantes : concentration finale d'albumine 2 p. 100, concentration finale d'enzyme 5 U. P./ml ; incubation pendant une heure à pH 3,5 et 45° C. La dégradation a été arrêtée en neutralisant le milieu en réaction par addition de soude. L'albumine dégradée a été conservée congelée à — 15° C.

4° SÉRUMS DE LAPIN ANTI-ALBUMINE. — Des lapins ont été immunisés par injection intraveineuse d'albumine humaine adsorbée sur

(*) Chargé de Recherches à l'Institut National d'Hygiène.

(**) Fellow of the Life Insurance Medical Research Fund.

(***) Manuscrit reçu le 31 mai 1960.

hydroxyde d'alumine. Les sérums ont été prélevés après une série d'injections de trois semaines comme précédemment [3] et après deux séries d'injections de trois semaines séparées par un intervalle de quinze jours.

5° DIÉTHYLAMINOÉTHYL CELLULOSE (DEAE-CELLULOSE), préparée suivant la méthode de Peterson et Sober [4] et fournie par Brown C°.

MÉTHODES.

1° ELECTROPHORÈSE ANALYTIQUE ET IMMUNO-ELECTROPHORÈSE EN GÉLOSE. — Les électrophorèses et les immuno-électrophorèses ont été faites selon la technique de Grabar et Williams [5] dans les conditions suivantes : gélose à 1 p. 100 ; tampon véronal sodique de pH 8,2 et force ionique 0,05 dans les bacs et 0,025 dans la gélose ; V/cm : 5 ; durée variable de trois à quatre heures.

Les électrophorèses simples ont été desséchées et colorées par le noir Amido selon la technique d'Uriel et Scheidegger [6].

2° ISOLEMENT DE L'INHIBITEUR. — Des électrophorèses préparatives de l'inhibiteur ont été faites dans les mêmes conditions que les électrophorèses analytiques, mais avec une plaque de gélose à 1 p. 100, de 18 cm de longueur, 24 cm de largeur et 0,4 cm d'épaisseur. Dans ces expériences, 5 ml d'albumine dégradée ont été mélangés avec 5 ml de gélose à 2 p. 100 et les 10 ml du mélange ont été mis dans un réservoir de 22 cm de longueur et 1 cm de largeur. Après électrophorèse, les plaques de gélose ont été découpées transversalement en tranches de 0,5 cm de largeur. Après congélation et décongélation des tranches de gélose, les solutions de protéines ont été récupérées par exsudation et filtration sous vide sur filtre de verre. Dans les conditions employées et après quatre heures d'électrophorèse, l'inhibiteur se trouve dans les tranches situées du côté de la cathode à 1,5 et 2,5 cm du réservoir.

L'inhibiteur a été également isolé par chromatographie sur colonne de DEAE-Cellulose. 15 ml d'albumine dégradée, dialysée contre une solution de tampon phosphate dipotassique 0,005 M pH 8,4, ont été passés sur une colonne de 6 g de DEAE-Cellulose équilibrée avec le même tampon. En lavant ensuite la colonne avec le même tampon, le premier produit éliminé est l'inhibiteur.

Les solutions d'inhibiteur ainsi préparées ont été concentrées par évaporation, dialysées contre du ClNa 0,15 M et conservées congelées à — 15° C.

3° PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE QUANTITATIVE. — La précipitation spécifique quantitative a été faite selon la technique d'Heidelberger et Kendall [7] et la quantité de précipité spécifique a été mesurée avec le réactif du biuret selon la technique décrite par McDuffie et Kabat [8].

4° INHIBITION DE LA PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE QUANTITATIVE. — L'inhibition de la précipitation spécifique quantitative a été faite avec des quantités respectives de sérum anti-albumine et d'albumine correspon-

dant au point d'équivalence. Des quantités croissantes d'inhibiteur ont été ajoutées à une même quantité de sérum anti-albumine et laissées une demi-heure à 37° C. L'albumine a été ajoutée ensuite. Les tubes, faits en duplicata, ont été laissés une heure à 37° C, quarante-huit heures à 4° C et les précipités spécifiques ont été lavés deux fois et dosés avec le réactif du biuret comme il est indiqué plus haut. Le pourcentage d'inhibition est donné par la relation :

$$\frac{\text{précipité spécifique sans inhibiteur} - \text{précipité spécifique avec inhibiteur}}{\text{précipité spécifique sans inhibiteur}} \times 100$$

5° HÉMAGGLUTINATION PASSIVE. — L'hémagglutination passive a été faite selon la technique de Boyden [9] dans les conditions décrites par Borduas et Grabar [10].

6° ULTRACENTRIFUGATION. — Nous avons utilisé une ultracentrifugeuse Spinco (modèle E). Toutes les mesures ont été effectuées à 20° C en ClNa 0,15 M. La constante de sédimentation a été calculée selon la technique décrite par Schachman [11].

7° Les quantités d'inhibiteur ont été mesurées avec le réactif du biuret de Weichselbaum modifié par Ditterbrandt [12] et sont exprimées en mg de protéine par rapport à une courbe de référence établie avec la sérumalbumine humaine.

RÉSULTATS.

1° ISOLEMENT DE L'INHIBITEUR. — La figure 1 montre les résultats de l'électrophorèse simple et de l'immuno-électrophorèse de l'albumine dégradée. On voit qu'il existe deux constituants principaux. L'un, qui migre vers l'anode, est très hétérogène et forme avec le sérum de lapin anti-albumine trois lignes de précipitation dénommées *a*, *b*, *c*. L'autre, qui migre vers la cathode, est plus homogène et ne forme pas de ligne de précipitation avec l'antisérum utilisé. C'est ce deuxième constituant que nous avons appelé « l'inhibiteur ».

L'inhibiteur a été isolé par électrophorèse préparative en gélose et chromatographie sur DEAE-Cellulose. L'électrophorèse analytique en gélose des produits obtenus montre qu'il s'agit de la même substance dans les deux cas.

2° ELECTROPHORÈSE ET ULTRACENTRIFUGATION DE L'INHIBITEUR. — En électrophorèse en gélose et en ultracentrifugation, l'inhibiteur se comporte comme un produit homogène.

Sa constante de sédimentation pour une concentration de 6 mg/ml est de 1,36 S. Il correspond donc à un fragment d'albumine dont on peut estimer le poids moléculaire être de 12 000 à 20 000.

3° PROPRIÉTÉS IMMUNOLOGIQUES DE L'INHIBITEUR. — a) *Inhibition de la précipitation spécifique du sérum de lapin anti-albumine humaine par l'albumine humaine.* La figure 2 montre les résultats de l'inhibition de différents sérums de lapin anti-albumine humaine par des quantités croissantes d'inhibiteur. On voit que, pour tous les sérums étudiés, l'inhibition n'est jamais totale. Elle tend vers

Immunoélectrophorèse et électrophorèse
en gélose de SAH dégradée par la protéase
de la rate de lapin.

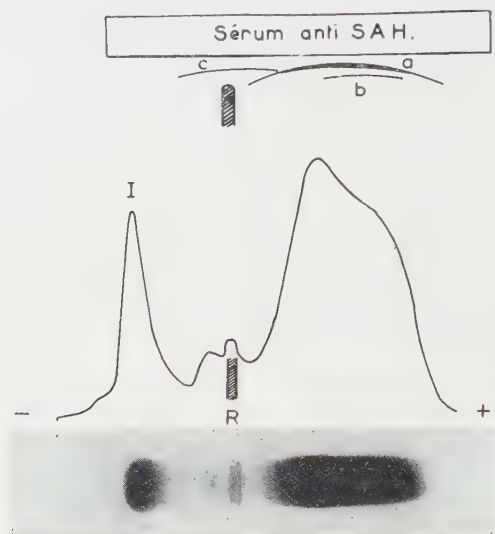


FIG. 1. — *En haut* : Représentation schématique d'une immuno-électrophorèse révélée avec un sérum de lapin anti-albumine humaine ne précipitant pas avec l'inhibiteur. *En bas* : Electrophorèse en gélose colorée par le noir Amido et son enregistrement photométrique. R : réservoir de départ ; I : inhibiteur.

un maximum, différent d'un sérum à l'autre et variant de 15 à 40 p. 100.

b) *Précipitation spécifique en milieu liquide.* L'inhibiteur donnait un précipité spécifique dosable avec deux des sérums étudiés. La figure 3 montre les courbes quantitatives obtenues avec ces deux sérums, l'albumine et l'inhibiteur. La quantité maximum de précipité spécifique obtenue avec l'inhibiteur est très faible et correspond à moins de 5 p. 100 de celle obtenue avec l'albumine. Les courbes de précipitation spécifique obtenues avec l'inhibiteur ont la forme classique des courbes de précipitation des systèmes protéines anti-

protéines avec une dissolution complète du précipité en excès d'antigène. L'analyse des surnageants de ces courbes montre l'existence d'un point d'équivalence.

c) *Immuno-électrophorèse de l'inhibiteur.* Nous avons utilisé le fait que l'inhibiteur précipitait avec certains des sérums anti-albumine pour l'étudier par immuno-électrophorèse. La figure 4

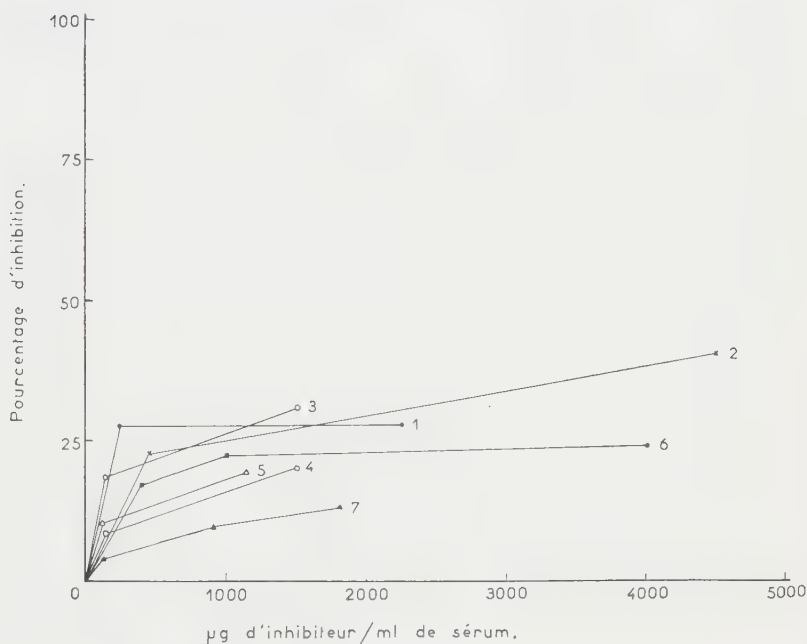


FIG. 2. — Etude de l'inhibition, par des quantités croissantes d'inhibiteur, de la précipitation spécifique de 7 sérums de lapin anti-albumine humaine avec l'albumine humaine.

montre qu'il forme une ligne de précipitation dans ces conditions et que cette ligne rejoint la ligne *c* formée par l'albumine dégradée.

Lorsque l'immuno-électrophorèse de la sérumalbumine humaine dégradée est révélée par un sérum saturé avec l'inhibiteur, les trois lignes de précipitation *a*, *b* et *c* persistent.

d) *Hémagglutination passive.* L'inhibiteur donne une réaction d'hémagglutination passive avec les sérums précipitant ou ne précipitant pas avec lui. Le tableau I montre que le titre maximum est obtenu avec des quantités d'inhibiteur de l'ordre de 100 µg

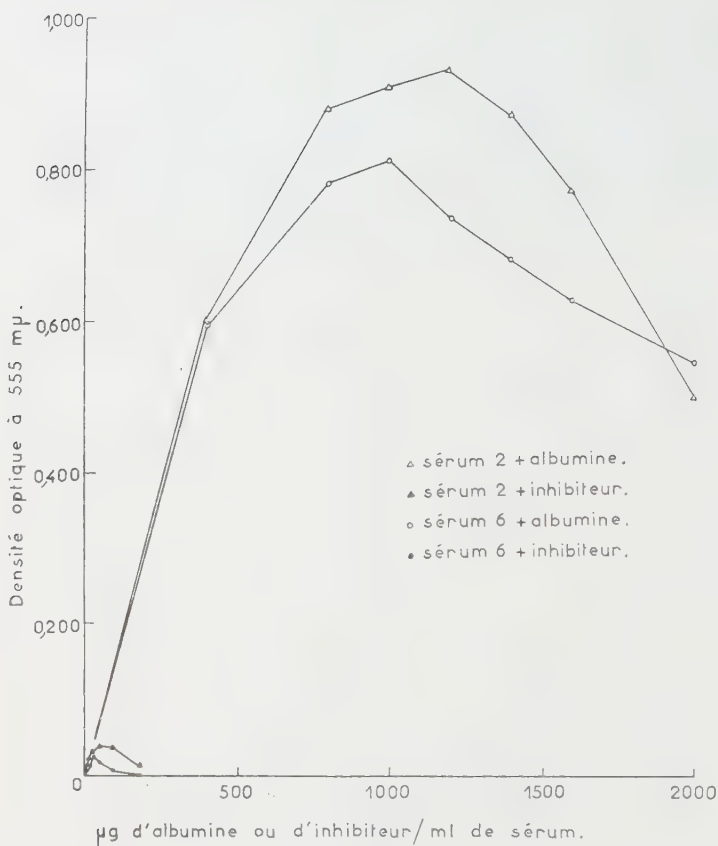


FIG. 3. — Courbes de précipitation spécifique formées par deux sérums de lapin anti-albumine humaine, l'albumine humaine et l'inhibiteur. En ordonnée : quantité de précipité spécifique/ml de sérum, exprimée en densité optique à 555 mμ.

SAH dégradée par la protéase de la rate de lapin

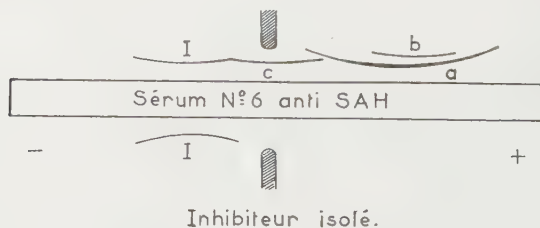


FIG. 4. — Immuno-électrophorèses révélées avec un sérum de lapin anti-albumine humaine précipitant avec l'inhibiteur.

par ml de globules rouges analogues à celles nécessaires pour obtenir le titre maximum avec l'albumine. Le tableau II montre

TABLEAU I. — Détermination par hémagglutination passive de la quantité d'inhibiteur nécessaire pour sensibiliser au maximum les globules rouges. Le sérum a été dilué de 2 en 2 ; le titre en anticorps correspond à l'inverse de la dernière dilution positive.

μg d'inhibiteur/ ml de globules rouges.	Titre du sérum.
25	800
50	1600
100	1600
200	1600
400	1600

TABLEAU II. — Détermination par hémagglutination passive du titre en anticorps de différents sérums anti-albumine vis-à-vis de l'inhibiteur et vis-à-vis de l'albumine. Les sérums ont été dilués de 2 en 2 ; les titres en anticorps correspondent à l'inverse de la dernière dilution positive.

N° des sérums	Titre des sérums.	
	Globules rouges sensibilisés avec 100 μg d'inhibiteur/ml de GR	100 μg d'albumine ml de GR
1	200	16000
2	800	32000
3	100	2000
4	200	4000
6	400	8000
8	400	8000
9	100	8000

que le titre obtenu avec l'inhibiteur est différent d'un sérum à l'autre et toujours très inférieur à celui obtenu avec l'albumine.

DISCUSSION.

Du point de vue électrophorétique, les produits de dégradation de la sérumalbumine humaine par un extrait de rate de lapin se répartissent en deux groupes [3, 43]. Le premier groupe correspond à une fraction qui a une mobilité électrophorétique voisine de celle de l'albumine et contient les différents constituants précipitant en immuno-électrophorèse avec le sérum de lapin anti-albumine humaine. Le deuxième groupe est fait de fractions multiples de mobilités nettement plus lentes que celle de l'albumine. L'inhibiteur

est le premier formé et le plus important de ces derniers constituants. Sa préparation est relativement facile, soit par électrophorèse puisqu'il est nettement séparé des autres constituants, soit par chromatographie sur DEAE-Cellulose puisqu'il est, dans nos conditions expérimentales, le premier produit élué. Enfin, ses propriétés électrophorétiques déterminées permettent de l'identifier facilement.

L'existence dans des hydrolysats d'albumine humaine de produits de dégradation ne précipitant pas mais se combinant avec des anticorps anti-albumine avait déjà été postulée [1, 14]. Le produit que nous avons isolé se comporte comme un inhibiteur du sérum de lapin anti-albumine humaine et confirme donc directement ce fait.

Le comportement de l'inhibiteur en électrophorèse et en ultracentrifugation semble montrer qu'il s'agit d'une seule substance ou d'une famille de substances ayant des propriétés très voisines. Toutes les molécules d'inhibiteur d'autre part, doivent se combiner avec les anticorps anti-albumine puisque la quantité d'inhibiteur nécessaire pour sensibiliser au maximum les globules rouges de mouton dans la technique d'héماغglutination passive est analogue à celle nécessaire avec l'albumine native et la plupart des antigènes protéiques [10].

L'inhibiteur ne se combine qu'avec une partie des anticorps anti-albumine comme le montrent les faits suivants : a) l'inhibition de la précipitation des anticorps anti-albumine par l'albumine est toujours partielle et très inférieure à 100 p. 100 ; b) pour un sérum donné, avec la technique d'héماغglutination passive, le titre en anticorps vis-à-vis de l'inhibiteur est toujours très inférieur au titre en anticorps vis-à-vis de l'albumine ; c) dans les deux cas où l'inhibiteur précipite avec les anticorps anti-albumine, la quantité maximum de précipité spécifique obtenue est très minime. L'existence dans le sérum de lapin anti-albumine de plusieurs types d'anticorps dirigés contre des groupements déterminants différents présents sur la molécule d'albumine a été démontrée antérieurement [3, 14]. Le comportement de l'inhibiteur montre qu'il ne porte que quelques-uns de ces groupements déterminants. Si l'on admet que la précipitation spécifique est liée à la formation d'un réseau nécessitant que l'antigène soit au moins bivalent, on peut théoriquement supposer que l'inhibiteur se comporte vis-à-vis des sérums avec lesquels il ne précipite pas comme un antigène monovalent portant un seul groupement déterminant. La formation d'un précipité spécifique avec deux des sérums étudiés peut, en appliquant le même raisonnement, s'expliquer par la présence sur l'inhibiteur d'un groupement déterminant de l'albumine ne suscitant que rarement et après une immunisation prolongée la formation d'anticorps.

Il a été démontré antérieurement [3] que l'albumine dégradée par un extrait de rate de lapin forme avec le sérum de lapin trois systèmes précipitants différents donnant, en immuno-électrophorèse, trois lignes de précipitation dénommées *a*, *b*, *c*. Dans le cas où l'inhibiteur précipite avec le sérum anti-albumine humaine, la ligne formée en immuno-électrophorèse rejoint la ligne *c*, ce qui montre qu'il existe une communauté antigénique entre l'inhibiteur et le ou les constituants formant la ligne *c*. Mais la saturation du sérum de lapin anti-albumine par l'albumine ne fait pas disparaître la ligne *c*, ce qui montre que l'inhibiteur ne porte qu'une partie des groupements déterminants des constituants formant la ligne *c*.

Les deux sérums précipitant avec l'inhibiteur provenaient de lapins immunisés par deux séries d'injections de trois semaines. Même dans ces conditions, ce fait reste rare, ce qui explique pourquoi il n'avait pas été observé dans l'étude antérieure [15] faite sur le comportement de différents sérums de lapin anti-albumine humaine vis-à-vis de la sérumalbumine humaine dégradée par un extrait de rate de lapin.

Les propriétés de l'inhibiteur que nous avons isolé dans ces conditions sont très différentes de celles des produits de dégradation de la sérumalbumine par la trypsine [14, 16]. En effet, il se forme, après hydrolyse trypsique, des fragments d'albumine dont les poids moléculaires sont du même ordre que celui de l'inhibiteur mais capables cependant de précipiter une grande partie des anticorps anti-albumine. Ceci confirme le fait déjà montré [14] que les propriétés immunologiques des fragments d'albumine obtenus après hydrolyse enzymatique sont très différentes suivant l'enzyme utilisée et liées vraisemblablement à la situation relative sur la molécule d'albumine des groupements déterminants et des points d'attaque des différentes enzymes.

RÉSUMÉ.

Un fragment de sérumalbumine dégradée par une protéase de la rate de lapin a été isolé par électrophorèse en gélose et par chromatographie sur DEAE-Cellulose. Il se comporte comme une substance homogène en électrophorèse en gélose et à l'ultra-centrifugation. Sa constante de sédimentation est de 1,36 S pour une concentration de 6 mg/ml.

Ce fragment d'albumine inhibe partiellement la précipitation spécifique de sérums de lapin anti-albumine humaine par l'albumine humaine et donne avec ces sérums une réaction d'hémagglutination passive positive. Il précipite avec une petite partie des anticorps de deux sérums de lapin anti-albumine humaine étudiés.

Il a été démontré que ce produit ne porte que quelques-uns des groupements déterminants de la molécule d'albumine.

SUMMARY

STUDY OF THE DEGRADATION OF HUMAN SERUMALBUMIN
BY A RABBIT SPLEEN EXTRACT.

VII. ISOLATION AND PROPERTIES OF A FRAGMENT
OF THE ALBUMIN MOLECULE.

A fragment of the albumin molecule was isolated from the products formed during the degradation of human serumalbumin by a rabbit spleen protease. Its isolation was achieved either by zone electrophoresis in agar or by chromatography on DEAE-Cellulose. This fragment behaves as a homogeneous substance in agar electrophoresis and in ultracentrifugation. It has a sedimentation constant of 1.36 S at a concentration of 6 mg/ml.

The albumin fragment partially inhibits the specific precipitation of rabbit anti-human albumin sera by human albumin and gives a positive passive haemagglutination reaction with such sera. It also precipitates with a very small proportion of the antibodies in two of the rabbit anti-human albumin sera studied. It has been shown that only a few of the antigenic determinant groups of the albumin molecule are supported by this split product.

★★

Nous remercions M^{me} J. Cavillon pour son aide technique.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LAPRESLE (C.) et DURIEUX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 62.
- [2] LAPRESLE (C.) et WEBB (T.). *Biochem. J.*, 1960, **76**, 538.
- [3] LAPRESLE (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 654.
- [4] PETERSON (E. A.) et SOBER (H. A.). *J. Amer. chem. Soc.*, 1956, **78**, 751.
- [5] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). *Bioch. Bioph. Acta*, 1955, **17**, 67.
- [6] URIEL (J.) et SCHEIDEGGER (J. J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 165.
- [7] HEIDELBERGER (M.) et KENDALL (F. E.). *J. exp. Med.*, 1935, **62**, 467.
- [8] McDUFFIE (F. C.) et KABAT (E. A.). *J. Immunol.*, 1956, **77**, 193.
- [9] BOYDEN (S. V.). *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 107.
- [10] BORDUAS (A. G.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 903.
- [11] SCHACHMAN (M. K.). In *Methods in Enzymology*, Academic Press, vol. IV, 1957.
- [12] DITTERBRANDT (M.). *Am. J. clin. Path.*, 1948, **18**, 459.
- [13] LAPRESLE (C.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1955, **37**, 969.
- [14] LAPRESLE (C.), KAMINSKI (M.) et TANNER (C. E.). *J. Immunol.*, 1959, **82**, 94.
- [15] LAPRESLE (C.) et DURIEUX (J.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, 833.
- [16] LAPRESLE (C.), WEBB (T.), KAMINSKI (M.) et CHAMPAGNE (M.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1959, **41**, 695.

**ÉTUDE BIOMORPHOLOGIQUE ET MANOMÉTRIQUE
DE L'OXYDATION ENZYMATIQUE
DE QUELQUES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES
PAR LES GLANDES VITELLINES
DE CERTAINS TRÉMATODES**

par A. DODIN, A. CAPRON et E. R. BRYGOO (*).

(*Institut Pasteur de Madagascar* [Directeur : J. COURDURIER],
et Laboratoire de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Lille
[Directeur : Professeur J. BIGUET])

La physiologie des helminthes a, ces dernières années, suscité un intérêt accru. Parmi les problèmes que pose leur connaissance physio-chimique, celui de la nature et du mode de formation des œufs et de leur coque est apparu à de nombreux chercheurs d'un particulier intérêt tant histochimique qu'immunologique.

Le processus généralement invoqué dans cette formation, celui de la synthèse et de la stabilisation des protéines, est un problème clé de la biologie, les connaissances récemment acquises permettant de penser que la formation des œufs chez les helminthes est un processus proche de celui de la formation des protéines structurales dans d'autres groupes animaux.

Selon Smyth et Clegg [14], on s'accorde à reconnaître la nature et le mode de formation de la coque des œufs de trématodes comme liés aux facteurs essentiels suivants :

- a) La structure de l'appareil génital femelle.
- b) Le cycle et la nutrition du parasite.
- c) Les caractéristiques physicochimiques du biotope.

C'est, en fait, l'étude de la structure même de l'appareil génital femelle qui domine les investigations actuelles.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 mai 1960.

RAPPEL MORPHOLOGIQUE.

Nous n'envisagerons pas ici l'anatomie détaillée de l'appareil génital femelle dont l'étude sort du cadre de ce travail. Rappelons simplement que chez la plupart des trématodes digénétiques :

1° Les œufs consistent en un ovule et un certain nombre de cellules vitellines entourées par une capsule protectrice ou « coque ».

2° L'organisation générale de l'appareil génital femelle comporte le plus souvent un ovaire unique, d'où part un court oviducte, rejoint en une région dite « ootype » par un canal issu du réservoir vitellin.

Au niveau de l'ootype s'ouvre un amas glandulaire appelé glande de Mehlis ou glande « coquillière ». Après l'ootype commence un utérus qui s'étend jusqu'au niveau de l'atrium génital et qui contient les œufs formés. Un canal aux fonctions obscures, le canal de Laurer, est souvent annexé à ces formations.

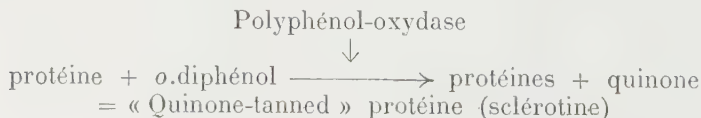
De plus, la majorité des trématodes digénétiques possèdent des glandes vitellogènes qui s'étendent latéralement le long du corps. Celles-ci sont formées de groupes de follicules réunis par de fins canalicules à un canal collecteur latéral longitudinal, d'où partent de chaque côté des canaux horizontaux qui gagnent le réservoir vitellin central situé généralement au-dessous de l'ootype.

RAPPEL PHYSIO-CHIMIQUE.

La glande de Mehlis a été considérée primitivement comme responsable de la formation de la coque de l'œuf, mais Leuckart [9] avait, dès 1886, montré que celle-ci était constituée aux dépens de globules contenus dans les cellules vitellines. De très nombreux travaux sont venus confirmer cette observation première. Nous ne citerons ici que ceux de Henneguy [6], Kouri et Nauss [8], Rees [11], Gonnert [5], Capron et Brygoo [3].

Le concept de la nature de la coque de l'œuf actuellement admis après les travaux de Stephenson [15], Smyth [12, 13], Johri et Smyth [7], Smyth et Clegg [14] en particulier, est celui de l'existence d'une protéine « quinone-tanned » (Smyth) ou « sclérotine » dont les précurseurs sont présents dans les globules des cellules vitellines.

Le schéma de formation selon Johri et Smyth [7] serait le suivant :



En fait le système enzymatique responsable de l'oxydation des phénols a été dénommé phénolase par Mason [10], et Smyth et Clegg [14] jugent préférable d'employer ce terme plutôt que celui de polyphénol-oxydase pour caractériser une action enzymatique dont on ignore encore la réelle spécificité.

La démonstration de l'existence, chez les trématodes, des divers termes de l'équation avancée par Johri et Smyth a été faite selon les méthodes histochimiques les plus classiques. Nous n'en ferons pas ici l'analyse. L'ensemble des travaux consacrés à ce problème semble avoir assuré l'existence, au niveau des vitellogènes des trématodes, de protéines et de phénols (1).

Par contre la mise en évidence du système enzymatique qui préside à l'oxydation du matériel phénolique que suggère le schéma précité, reste encore discutable. Après les premières tentatives infructueuses de Stephenson [15] chez *Fasciola hepatica*, Smyth [13] introduit une méthode histochimique fondée sur l'oxydation du catéchol par l'enzyme.

L'incubation de coupes à congélation de distomes dans une solution à 0,2 p. 100 de catéchol [o.dihydroxybenzène] (2) à 40° C, pH 6,2, développe en dix minutes une coloration brun-rouge des globules vitellins.

Cette coloration est interprétée par Smyth comme due à la production d'une protéine « sclerotin-type », par tannage des protéines basiques des globules vitellins par l'ortho-quinone formé *enzymatiquement* à partir du catéchol. Elle est obtenue, d'ailleurs, chez les distomes fixés à l'alcool 70° et mis à incuber dans une solution à 0,2 p. 100 de catéchol.

Toutefois, si l'oxydation *enzymatique* reste l'explication la plus probable, Smyth accorde qu'il n'a pas été possible d'en apporter la démonstration. Un certain nombre de trématodes ont été soumis à cette technique. Leur liste serait fastidieuse. Il convient toutefois de rapporter que *Schistosoma mansoni* ne développe après incubation au catéchol aucune coloration spécifique (Smyth et Clegg).

Il apparaît d'autre part de quelque intérêt de rapprocher de l'ensemble de ces travaux les recherches poursuivies par Bouchilloux, Lissitzky et Kertesz [1], Bouchilloux et Lissitzky [2], sur l'oxydation de divers substrats par la polyphénolyoxydase isolée de *Psalliotus campestris* et le mécanisme de l'oxydation enzymatique du catéchol par ce même enzyme.

Après avoir confirmé les travaux de Smyth nous nous sommes attachés à mettre en évidence des trématodes maintenus en

(1) Les lecteurs intéressés par ce problème se référeront utilement au récent et important travail de Smyth et Clegg [14].

(2) En réalité l'o.dihydroxybenzène utilisé par Smyth est le pyrocatéchol.

survie, l'oxydation enzymatique de certains composés phénoliques dont le catéchol et la tyramine, d'une part, en observant le brunissement obtenu après incubation dans ces substrats, d'autre part en étudiant le QO_2 calculé au manomètre de Warburg d'un nombre n de trématodes, mis en présence de ces mêmes substrats.

Nous avons tenté de préciser la spécificité du système enzymatique en appliquant les mêmes techniques d'investigation à d'autres composés non phénoliques, tels l'éphédrine (chlorhydrate de 1-phényl-2-méthylaminopropanol).

MATÉRIEL ET TECHNIQUES.

1° Trématodes.

Nous avons utilisé pour notre expérimentation des distomes du genre *Lepoderma* (3), qui parasitent communément l'intestin antérieur et moyen du *Chamaeleo lateralis* de Tananarive. Avant tout essai les douves étaient lavées à trois reprises en eau physiologique.

2° Bains d'incubation.

a) Milieu à la tyramine.

Eau physiologique	1 ml
Tampon phosphate 0,01 M pH 7,2	1 ml
Chlorure de tyramine 0,25 M	1 ml

Pour la recherche de l'activité tyramino-oxydasique selon Dianzani (1953), nous avons utilisé le milieu suivant :

Chlorure de néotétrazolium à 1/100 en eau distillée.	1 vol.
Eau physiologique	1 vol.
Tampon phosphate 0,01 M pH 7,2	1 vol.
Chlorure de tyramine 0,25 M	1 vol.

b) Milieu au pyrocatéchol.

Eau physiologique	1 ml
Tampon phosphate 0,01 M pH 7,2	1 ml
<i>o</i> .dihydroxybenzène 0,25 M	1 ml

Les bains d'incubation à la thyroxine et l'éphédrine furent conçus aux mêmes concentrations moléculaires. Les solutions témoins étaient représentées par du tampon et de l'eau physiologique.

Les distomes au nombre de 5 à 20 par bain étaient mis en incubation pendant douze heures dans une étuve réglée à 32°.

Par ailleurs, dans l'intention de confirmer les observations de Smyth, des distomes *in toto* fixés à l'alcool 70° furent mis, après lavage, en incubation à 40° C pendant deux heures.

(3) Le distome que nous dénommerons ici *Lepoderma*, est actuellement en cours de description.

ETUDE MANOMÉTRIQUE.

Les douves, réparties en lots homogènes, sont lavées trois fois en tampon phosphate 0,01 M pH 7,2. Elles sont numérotées et placées sous un volume de 0,5 ml en tampon phosphate dans la cuve de la fiole de Warburg. Dans l'ampoule centrale, un rouleau de papier filtre Wratten est imbibé de KOH 10 N, 0,2 ml. Dans l'ampoule latérale on place les substrats sous un volume de 0,5 ml. L'ensemble est mis en équilibre quinze minutes ; on renverse ensuite le contenu de l'ampoule latérale dans la cuve.

L'étude de l'absorption d'oxygène est poursuivie trois heures à 32°, agitation, 3,5 cm d'amplitude, PO 657 mm Hg.

RESULTATS

I. — ETUDE BIOMORPHOLOGIQUE.

1° Action du catéchol.

a) *Distomes « in toto » après fixation.* — Confirmant les observations de Smyth, nous avons obtenu un brunissement sélectif des globules vitellins par incubation de distomes fixés à l'alcool et lavés à l'eau distillée, dans une solution de catéchol à 0,2 p. 100, à 40° C pendant une heure.

b) *Distomes vivants.* — Nous nous sommes alors proposé d'étudier l'oxydation du catéchol par les douves maintenues en survie dans les bains d'incubation décrits.

A la concentration de 1/500 aucun brunissement ne se développe et les distomes sont rapidement tués par la toxicité du substrat.

Utilisant alors des dilutions progressives de 1/750 à 1/8 000, nous avons pu constater que l'oxydation du catéchol par les vitellogènes du trématode *vivant* intervenait entre ces limites avec un maximum, apprécié par l'intensité du brunissement à l'observation microscopique, aux dilutions de 1/2 000 et 1/4 000.

Il nous est apparu que, par rapport à l'expérimentation de Smyth, l'obtention d'une oxydation *in vitro* par les vitellogènes des distomes maintenus en survie rendait de plus vraisemblable la nature enzymatique du processus. Les distomes vivants après douze heures d'incubation développent, au niveau des globules vitellins, une coloration brun-rouge qui isole de l'anatomie générale de l'helminthe le système vitellin (glandes vitellines, vitello-

ductes latéraux et horizontaux, réservoir vitellin) en lui conférant un brunissement remarquablement sélectif (fig. 1 et 2).

Il convient de noter que cette coloration résiste parfaitement aux fixations habituelles (alcool, alcool-formol, formol 1,0 p. 100, Bouin), ne disparaît pas après traitement avec des colorants généraux tels l'hémalun ou le carmin et peut dès lors être utilisée par les systématiciens dans l'étude plus précise du système génital femelle, celui-ci n'étant pas toujours d'un examen aisé.



FIG. 1. — *Lepoderma* sp. *in toto* : Brunissement du système vitellin et des œufs du distome vivant après incubation de trois heures dans le chlorhydrate de tyramine.

2° Action de la tyramine.

Dans une première série d'expériences nous avons examiné des douves montées *in toto*. Nous avons ensuite confirmé et précisé les premières observations par une étude histologique du matériel.

Quatre-vingts *Lepoderma* sont répartis en quatre lots A, B, C et D, comprenant des spécimens de taille et d'âge physiologique variés.

Les douves du lot A sont tuées par l'alcool à 70° chauffées à ébullition, le contact est maintenu dix minutes, puis les douves sont lavées en eau physiologique.

Les douves des lots B, C et D sont utilisées vivantes.

Le lot D sert de témoin. Les lots A et B sont mis en présence

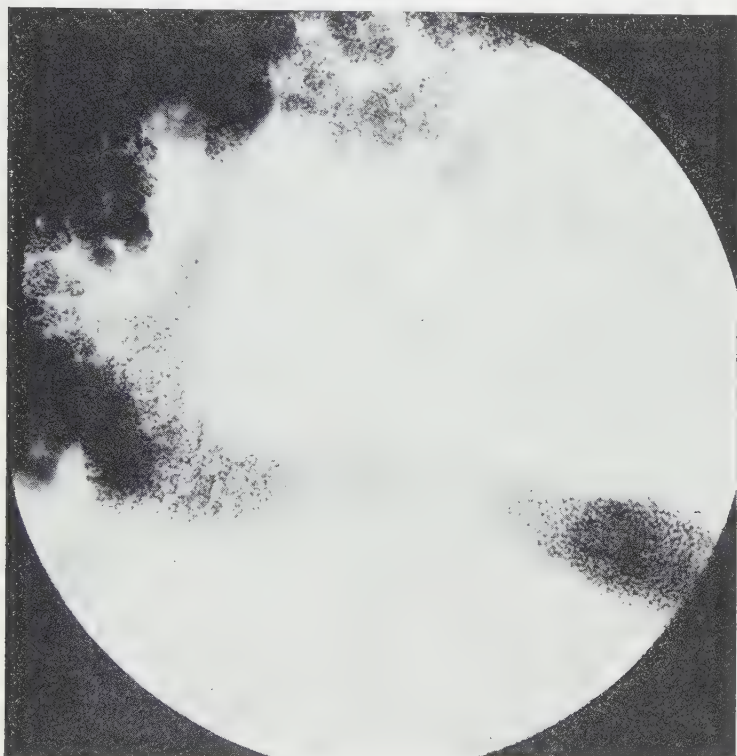


FIG. 2. — Détail des vitelloductes et de quelques lobules vitellins.

de tyramine seule, le lot C en présence de tyramine et de néotétrazolium.

A la fin de l'expérience, aucune des douves ne présente plus d'activité.

Une partie des douves du lot C est traitée immédiatement au sortir de l'étuve par l'acétone à la température du laboratoire pendant deux heures ; les douves sont ensuite lavées en eau physiologique.

La fixation fait intervenir trois techniques différentes :

- a) Alcool chaud, puis alcool à 70° pendant vingt-quatre heures.
- b) Eau physiologique formolée à 10 p. 100 avec du formol neutre du commerce, pendant vingt-quatre heures.
- c) Liquide de Bouin pendant vingt-quatre heures.

Des montages histologiques ont permis de comparer, sur une même préparation, soit l'action de la tyramine, soit l'influence de la fixation. La coloration sur une même lame des spécimens provenant des différents lots facilitait la comparaison en éliminant l'influence des variations dues à des artifices de préparation.

L'observation des différents montages permet de constater :

a) Une coloration élective de l'ensemble des globules vitellins des douves vivantes, en brun-jaune, par la tyramine (lots B et C) : cette coloration est parfaitement visible quel que soit le fixateur employé.

b) L'absence de coloration des globules des douves témoins (lot D), pour lesquelles seuls les œufs présentaient leur coloration brunâtre habituelle.

c) La non-coloration de la plupart des globules des vitellogènes des douves tuées par l'alcool (lot A). L'examen attentif des spécimens de ce lot montre que les globules des lobules les plus externes, les plus proches de la cuticule, sont incolores, alors que les lobules para-axiaux peuvent présenter cette coloration. Tout se passe comme si les tissus de la partie centrale n'avaient pas été fixés par l'action trop rapide de l'alcool. Ceci est d'ailleurs confirmé par la non-coloration par la tyramine des individus fixés vingt-quatre heures à l'alcool et examinés *in toto*.

3° Essai de mise en évidence d'une action tyramino-oxydasique.

L'incubation dans le milieu de Dianzani [4] n'a pas permis d'observer la formation de formazan au niveau des vitellogènes. L'activité enzymatique semble donc ne pouvoir être rapportée à une action tyraminasique.

4° Action de différentes substances plus ou moins voisines chimiquement.

Nous avons essayé, dans les mêmes conditions expérimentales, l'action de la tyrosine, de la spermine, de l'adrénaline. Aucune de ces substances n'entraîne de coloration des globules vitellins.

Par contre la thyroxine et l'éphédrine, à des concentrations moléculaires superposables, permettent d'obtenir un brunissement net des globules vitellins.

5° Relation avec la substance acido-alcool-résistante.

Nous avons tenté d'étudier la relation entre la coloration des globules vitellins ainsi obtenue et la substance AAR précédem-

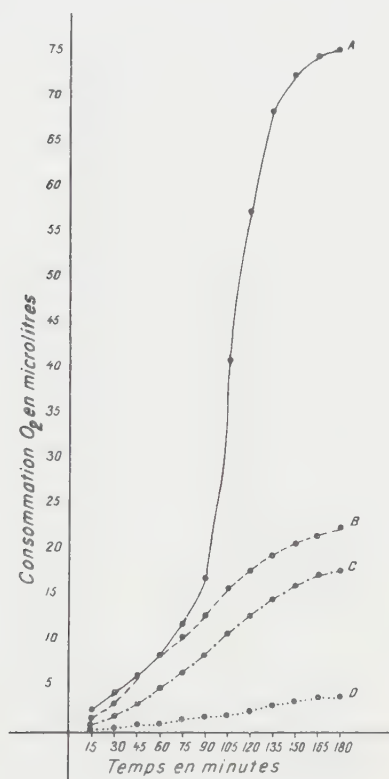


FIG. 3. — Courbe A. Oxydation de 250 μg de catéchol par 50 douves. Courbe B. Oxydation de 250 μg de catéchol par 50 douves ayant été immergées trois heures dans une solution de catéchol. Courbe C. Respiration endogène de 50 douves en tampon phosphaté. Courbe D. Oxydation spontanée à 32 de 250 μg de pyrocatechol.

ment mise en évidence [3] dans les globules vitellins de ces mêmes distomes. Des colorations au Ziehl, pratiquées sur des coupes sagittales de distomes antérieurement mis en incubation dans le pyrocatechol ou la tyramine, nous ont permis de nous assurer que le phénomène de brunissement et la coloration par la méthode de Ziehl intéressent des produits de sécrétion différents.

CAS PARTICULIER DE *Schistosoma mansoni*. — Une expérimentation actuellement en cours permet de penser que des phénomènes d'oxydation identiques interviennent au niveau des glandes

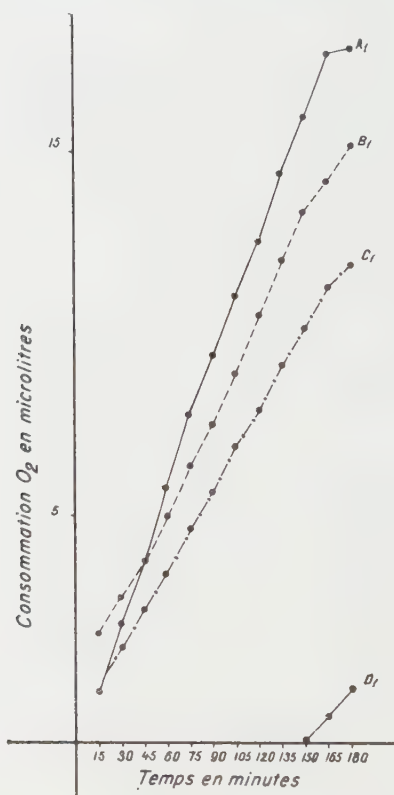


FIG. 4. — Courbe A₁. Oxydation dans une solution de tyramine 0,25 M par 25 douves. Courbe B₁. Respiration de 25 douves en solution glucosée 0,2 M. Courbe C₁. Respiration de 25 douves en tampon phosphaté. Courbe D₁. Respiration endogène.

vitellines de *S. mansoni*. Nous en envisagerons les modalités dans un prochain travail.

CONCLUSIONS. — De cette expérimentation nous pouvons retenir les faits suivants :

1° La tyramine agit *in vivo* sur les douves du genre *Lepoderma*

en entraînant un brunissement très intense des globules vitellins.

2° Cette action de la tyramine ne se produit pas sur matériel fixé.

3° Cette action de la tyramine ne correspond pas à une activité tyramino-oxydasique.

II. — ETUDE MANOMÉTRIQUE.

RÉSULTATS. — Nous avons tracé les courbes obtenues :

1° Avec le catéchol (fig. 3).

a) 250 μ g de catéchol sous un volume de 0,5 ml sont mis en contact immédiat avec 50 douves.

Courbe A. Q_{O_2} 120 minutes = 58 μ l d' O_2 .

b) 250 μ g de catéchol sous un volume de 0,5 ml sont mis en contact immédiat avec 50 douves ayant été immergés pendant trois heures dans une solution de pyrocatechol 0,05 M.

Courbe B. Q_{O_2} 120 minutes = 18 μ l.

c) La courbe C donne la respiration endogène de 50 douves en tampon phosphaté.

Courbe C. Q_{O_2} 120 minutes = 13 μ l d' O_2 .

La courbe D représente l'oxydation spontanée à 32° du pyrocatechol.

Courbe D. Q_{O_2} 120 minutes = 3,5 μ l d' O_2 .

2° Avec la tyramine (fig. 4.).

a) 25 douves ont été mises au contact immédiat de 0,5 ml d'une solution de tyramine 0,25 M.

Courbe A₁. Q_{O_2} 120 minutes = 12 μ l d' O_2 .

b) 25 douves respirant en tampon phosphate ont donné la courbe B₁. Q_{O_2} 120 minutes = 7,2 μ l d' O_2 en tampon phosphate avec glucose 0,2 M.

Courbe C₁. Q_{O_2} 120 minutes = 9,6 μ l d' O_2 .

3° Avec la thyroxine (fig. 5).

25 douves en présence de 0,5 ml d'une solution de thyroxine 0,77 M donnent la courbe A₂. Q_{O_2} 120 minutes = 10,8 μ l d' O_2 .

4° Avec l'éphédrine (fig. 5).

25 douves en présence de 0,5 ml d'une solution d'éphédrine 0,5 M donnent la courbe B_2 . Q_{O_2} 120 minutes = 9,2 μ l d' O_2 .

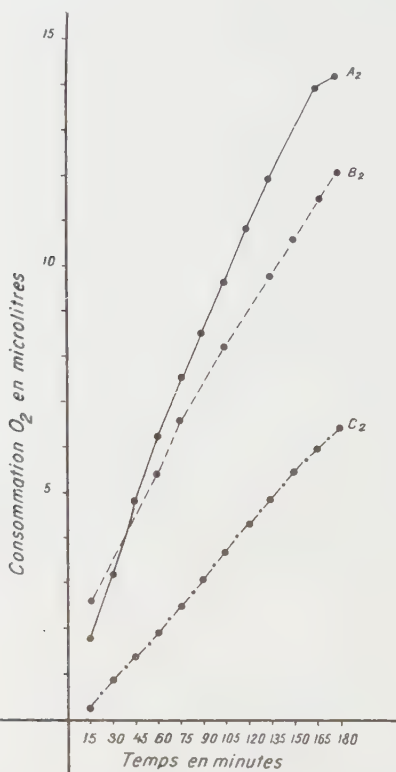


FIG. 5. — Courbe A_2 . Respiration de 25 douves en présence d'une solution de thyroxine 0,77 M. Courbe B_2 . Respiration de 25 douves en présence d'une solution d'éphédrine 0,5 M. Courbe C_2 . Respiration de 25 douves en solution de tampon phosphaté.

Le témoin, 25 douves en tampon phosphate : courbe C_2 . Q_{O_2} 120 minutes = 4,2 μ l.

DISCUSSION.

1° L'étude de la cinétique des réactions, appréciée par les courbes de respiration, permet d'envisager un mécanisme enzymatique de l'oxydation du catéchol qui apparaît, dans les limites

de l'observation microscopique, lié au système vitellin. L'intervention de ce dernier se trouve démontrée par l'apparition d'une coloration brun intense à son niveau.

2° L'identification du mécanisme enzymatique n'est pas précisée. L'hypothèse émise par Johri et Smyth apparaît vraisemblable. Il faut cependant noter l'oxydation du chlorhydrate de 1-phényl-2-méthyl-aminopropanol ou éphédrine.

CONCLUSIONS. — L'étude biomorphologique d'une part, et manométrique d'autre part, de l'oxydation de quelques composés phénoliques (catéchol, tyramine, etc.) par les glandes vitellines de certains trématodes permet, dans les limites de notre expérimentation (trématodes maintenus en survie dans leur bain d'incubation) de confirmer les hypothèses de Smyth quant à la nature enzymatique du processus d'oxydation.

Peu de précisions complémentaires peuvent par contre être apportées quant à la spécificité du système enzymatique en cause. L'oxydation de l'éphédrine permet d'envisager un système enzymatique moins spécifique que celui d'une phénolase. Il est permis de penser que la connaissance plus précise du mécanisme de tannage des protéines génitales des helminthes peut influencer sur l'orientation de recherches thérapeutiques visant à leur stérilisation.

RÉSUMÉ.

Les auteurs apportent, au moyen d'une étude biomorphologique et manométrique de certains trématodes maintenus en survie (avec référence à *S. mansoni*), la démonstration d'une oxydation enzymatique de certains composés phénoliques par les glandes vitellines, se traduisant par un brunissement intense de ces glandes et des œufs *in utero*.

Après les premiers travaux de Smyth (1954-1959), effectués sur coupes à congélation ou matériel fixé, la nature enzymatique du processus d'oxydation se trouve ainsi confirmée. Le système en cause apparaît voisin de celui d'une phénolase. Il pourrait intervenir dans un processus thérapeutique visant à la stérilisation des helminthes.

SUMMARY

BIOMORPHOLOGICAL AND MANOMETRIC STUDIES ON ENZYMIC OXIDATION OF SOME PHENOL COMPOUNDS BY VITELLIN GLANDS OF CERTAIN TREMATODES.

The studies, carried out on certain living Trematodes (and a few samples of *S. mansoni*), demonstrate this oxidation, which results in an intensive browning of these glands and the eggs *in utero*.

These findings confirm Smyth's work (1954-1959), which was performed on congelation sections or fixed material, and demonstrate the enzymic character of the oxidation process. The responsible enzyme seems to be a phenolase. It might play a part in a treatment with a view to sterilisation of helminths.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BOUCHILLOUX (S.), LISSITZKY (S.) et KERTESZ (D). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1957, **39**, 1049-1058.
 - [2] BOUCHILLOUX (S.) et LISSITZKY (S.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1958, **40**, 833-849.
 - [3] CAPRON (A.) et BRYGOO (E. R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1959, **52**, 574-577.
 - [4] DIANZANI (M. U.). *Nature*, 1953, **171**, 125-126.
 - [5] GONNERT (R. Von). *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 1955, **6**, 33-52.
 - [6] HENNEGUY (L. F.). *Arch. anat. Microscop.*, 1906, **9**, 47.
 - [7] JOHRI (L. N.) et SMYTH (J. D.). *Parasitology*, 1956, **46**, 107-116.
 - [8] KOURI (P.) et NAUSS (R. W.). *J. Parasitol.*, 1938, **24**, 291-310.
 - [9] LEUCKART (K. G. F. R.). *Die Parasiten des Menschen und die von ihnen herrührenden Krankheiten*, 2^e édit., Leipzig, 1886.
 - [10] MASON (H. S.). *Advances in Enzymol.*, 1955, **16**, 105-124.
 - [11] REES (F. G.). *Parasitology*, 1939, **31**, 417-433.
 - [12] SMYTH (J. D.). *Stain Technol.*, 1951, **26**, 255-256.
 - [13] SMYTH (J. D.). *Quart. J. microscop. Sci.*, 1954, **95**, 139-152.
 - [14] SMYTH (J. D.) et CLEGG (J. A.). *Exper. Parasitol.*, 1959, **8**, 286-323.
 - [15] STEPHENSON (W.). *Parasitology*, 1947, **38**, 128-139.
-

**COMPARAISON DE L'INDUCTION DE MUTANTS
PROTOTROPHES PAR LES RAYONS X ET U.V.
CHEZ "ESCHERICHIA COLI" B_r TRY-**

par T. KADA, E. BRUN et H. MARCOVICH (*).

*(Service de Radiobiologie et de Cancérologie
de l'Institut Pasteur, Paris)*

En 1956, Witkin constata que chez des bactéries auxotrophes soumises aux rayons U. V., la fréquence des mutants prototrophes induits était plus élevée si les suspensions étaient étalées sur un milieu enrichi de bouillon que si elles étaient étalées sur un milieu minéral minimum. Les conditions de préculture étaient prépondérantes, car ces mutants potentiels ne s'observaient que si les bactéries avaient poussé en bouillon avant d'être irradiées, au contraire de celles précultivées sur milieu minimum. Dans ces expériences, les auxotrophes étalés sur milieu enrichi de bouillon subissaient quelques divisions résiduelles, à la faveur desquelles des mutations pouvaient se produire. Mais la contribution des divisions était faible à côté de l'action proprement dite du bouillon sur l'expression même du caractère prototrophe chez les bactéries mutées. L'expression des mutants nécessitait pour s'établir un délai de l'ordre de soixante minutes.

Au cours du même travail, Witkin rechercha comment s'exprimait le caractère prototrophe quand celui-ci se trouvait transduit par l'intermédiaire d'un bactériophage, et trouva que l'expression était immédiate. Cette différence suggérait que certaines étapes intermédiaires étaient nécessaires entre l'absorption de l'énergie radiante et la stabilisation du caractère mutant. La différence constatée entre le milieu minimum et le bouillon fut attribuée à la nécessité d'une synthèse protéique. L'inhibition de l'action du bouillon par le chloramphénicol fut considérée comme une preuve en faveur de cette conception.

Une autre explication subsistait néanmoins. Les rayons U. V., en même temps qu'ils sont absorbés au niveau du chromophore

(*) Manuscrit reçu le 23 mai 1960.

spécifique auquel se trouve liée l'action mutagène, libèrent de l'énergie au niveau d'autres molécules, les altèrent et pourraient entraver certains processus métaboliques. Ces lésions « satellites », pourraient empêcher notamment l'expression d'une fraction des mutants et le bouillon aurait sur elles une action « restauratrice ».

Pour vérifier cette hypothèse, il était indiqué d'avoir recours à des agents mutagènes dont le mécanisme d'action soit fondamentalement différent de celui des rayons U. V. On s'est adressé aux rayons X, dont on sait que l'énergie est absorbée en fonction de la masse des atomes du milieu et non des liaisons que ces atomes contractent entre eux. Deux autres différences importantes existent, qui justifient leur choix comme élément de comparaison. En premier lieu, à énergie absorbée égale les rayons X sont beaucoup plus actifs que les rayons U. V. Ainsi en est-il de l'action létale chez les bactéries (Demerec et Latarjet, 1946) chez les phages λ et l'induction lysogénique de K12(λ) [Marcovich, 1956].

En second lieu, et probablement en raison de leur efficacité plus grande, les rayons X détruisent plus électivement certaines propriétés cellulaires sans en affecter sensiblement d'autres. Par exemple, des levures, stérilisées par des rayons X, peuvent subir une adaptation enzymatique (Baron, Quastler et Spiegelman, 1953), des bactéries lysogènes K12(λ), induites par les rayons X à produire du phage, ont le même rendement en virus et la même durée de période latente quelle que soit la dose. Il en est de même pour des bactéries K12S exposées aux rayons X avant d'être infectées par du phage λ (Marcovich, 1957). Au contraire, dans les exemples cités les rayons U. V. dépriment considérablement l'adaptation et le rendement en virus des bactéries lysogènes ou infectées. On peut encore mentionner, à l'appui de ce qui vient d'être dit, que les colonies de bactéries survivantes à une irradiation X, même pour des doses très élevées, se forment dans les mêmes délais que le témoin non exposé, tandis que dans le cas des U. V. les délais sont plus grands (Marcovich, 1957, *loc. cit.*).

Les résultats auxquels a conduit cette étude montrent que l'enrichissement en bouillon n'influe pas sur des lésions satellites éventuelles, mais agit vraisemblablement sur des étapes proches de l'effet primaire du rayonnement.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE.

1° SOUCHE.

Il s'agit d'*Escherichia coli* B/r WP 2 Try⁻ auxotrophe pour le tryptophane. Elle nous a été communiquée par le Dr Witkin. On étudie la réversion vers la prototrophie Try⁻ $\longrightarrow$ Try⁺. La fréquence des

Try+ sur milieu minimum est de 2.10^{-8} environ. Cette valeur particulièrement basse est une caractéristique de la souche

2° MILIEUX.

a) Milieu synthétique (milieu minimum) [Vogel et Bonner, 1956].

MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,20 g
Acide citrique, H ₂ O	2 g
K ₂ HPO ₄ anhydre	10 g
NH ₄ NaHPO ₄ , 4 H ₂ O	3,50 g
Glucose (stérilisé séparément en solution à 40 p. 100)	4 g
H ₂ O distillée	Q. S. P. 1 000 cm ³

b) Milieu bouillon peptone liquide.

Nutrient Broth « Difco »	8 g
NaCl	5 g
Peptone « UCLAF »	8 g
H ₂ O distillée	Q. S. P. 1 000 cm ³

c) Milieux solides. — On incorpore, sauf indication contraire, 1,5 p. 100 de gélose « Bacto Agar Difco » aux milieux ci-dessus.

Ces milieux sont autoclavés à 120° C pendant vingt-cinq minutes.

d) *Facteurs ajoutés aux milieux.* — Les milieux enrichis en bouillon contiennent de 0,01 à 15 p. 100 de bouillon peptone ajouté au milieu synthétique. La concentration utilisée est, à moins de spécification particulière, 5 p. 100 de bouillon.

Dans certaines expériences, on ajoute au milieu minimum un mélange des 17 acides aminés suivants, à la concentration finale de 10 µg/cm³ : DL-alanine, L-arginine base, DL-acide aspartique, cystéine chlorhydrate, L-acide glutamique, glycine, L-histidine base, DL-isoleucine, DL-leucine, L-lysine bichlorhydrate, DL-méthionine, DL-phénylalanine, L-proline, DL-sérine, L-tyrosine, DL-valine.

Le tryptophane, acide aminé essentiel, est utilisé à la concentration de 20 µg/cm³. Cette quantité n'est pas limitante pour une culture d'auxotrophes Try— dans le milieu synthétique décrit plus haut.

3° CONDUITE DES EXPÉRIENCES.

a) Les bactéries sont conservées en glacière sur gélose inclinée contenant 2,5 p. 100 de bouillon peptone et transplantées tous les trois mois.

b) A partir de ce stock, on prépare une suspension-mère en bouillon dans lequel la culture a poussé à 37° C pendant seize heures. Les bactéries sont centrifugées à 2 500 tours/minute, lavées deux fois avec une solution de NaCl à 0,8 p. 100 et mises en milieu synthétique non glucosé. La suspension contient environ 2.10^9 bactéries/cm³; elle est conservée en glacière, et sert pendant un mois.

c) A partir de cette suspension mère on ensemence 10^9 bactéries dans 200 cm³ de bouillon et on aère par barbotage pendant dix heures. La densité a atteint alors 2.10^9 cellules/cm³. On lave et on concentre par centrifugation. Cette suspension est alors soumise aux radiations, puis examinée du point de vue de l'action de l'enrichissement en bouillon ou

en acides aminés en ce qui concerne la fréquence des mutants Try⁺. On désignera par mutants « minimums » ceux qui apparaissent en milieu synthétique, et par mutants « enrichis » ceux du milieu synthétique additionné de bouillon ou d'acides aminés.

4° SOURCES DE RAYONNEMENTS ET TECHNIQUES D'IRRADIATION.

a) *U. V.* — La source est une lampe germicide MAZDA à vapeur de mercure à basse pression donnant un rayonnement quasi monochromatique de 2 537 Å. Le débit de dose à la surface de la préparation est de 17 ergs/mm² sec⁻¹. Il est contrôlé par un dosimètre photoélectrique (Latarjet, Morenne et Berger, 1953).

La suspension de 2.10⁹ cellules/cm³ en milieu synthétique non glucosé est irradiée en boîtes de Petri de 9 cm de diamètre sous un volume de 8 cm³, étant agitée doucement.

b) *Rayons X.* — On utilise un tube Machlett type AEG 50, à anticathode de tungstène, à fenêtre de béryllium, sans filtre. Il fonctionne sous une tension de 40 kV et avec une intensité de 30 à 40 mA. Le débit à la surface de la préparation est estimé de 30 à 80 kr/min.

La suspension bactérienne ramenée à 2.10¹⁰ cellules/cm³, sous un volume de 7 cm³, est mise dans une boîte de Petri. L'épaisseur de la couche liquide irradiée est de 1 mm.

c) *Rayons α.* — On a utilisé une technique mise au point par Devoret (non publiée). La source de rayons α consiste en un disque d'argent de 10 mm de diamètre à la surface duquel on a déposé une couche de polonium. On met, au moyen d'une micropipette, 0,01 cm³ d'une suspension bactérienne à 10¹⁰ cellules/cm³, dans de petites boîtes de Petri de 15 mm de diamètre contenant du milieu synthétique gélosé. On étale et on expose à froid à 10 mm de la source. Les bactéries sont ensuite recueillies par lavage.

d) *Illumination.* — Pour les expériences de photorestauration, on utilise une lampe Philips à vapeur de mercure à haute pression de 500 watts, à enveloppe de verre et refroidie par une circulation d'eau.

La suspension bactérienne (10⁹ cellules/cm³) sous un volume de 4 cm³ est placée dans une boîte de Petri de 7 cm de diamètre à 50 mm de la lampe, et maintenue dans la glace fondante. Le débit de dose est estimé à 1,20 joules/mm⁻²/sec⁻¹.

Dans la suite de ce travail nous désignerons par irradiation l'exposition aux rayons X et U. V., et par illumination celle à la lumière visible (Latarjet et Miletic, 1953).

RÉSULTATS.

1° ENRICHISSEMENT ET DIVISIONS RÉSIDUELLES.

La technique qui consiste à ensemercer des auxotrophes dans un milieu synthétique enrichi d'une faible quantité de bouillon ou de facteurs de croissance permet à la population entière de subir quelques divisions résiduelles. Le nombre total de ces divisions,

et par conséquent le nombre de mutants prototrophes qui s'induisent à leur occasion, ne dépendent que du degré d'enrichissement du milieu et non de la grandeur de l'inoculum.

Les bactéries non irradiées et celles qui survivent à l'irradiation (on étale dans ce dernier cas des cellules capables de se diviser et

TABLEAU I. — Effet sur la fréquence des mutants Try⁺ spontanés de l'enrichissement en bouillon des boîtes de Petri.

Nombre de bactéries auxotrophes étalées par boîte	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$1,4 \times 10^6$
Pourcentage de bouillon peptone mis dans 20 cm ³ de milieu minimum (cm ³ par boîte).	Fréquence des Try ⁺ ($\times 10^{-7}$)		
0 (0)	3	0	0
0,10 (0,02)	1	0	0
0,25 (0,05)	3	3	2
0,50 (0,1)	0	2	4
1,0 (0,2)	4	3	10
2,5 (0,5)	13	12	12
5,0 (1,0)	10	22	22
10,0 (2,0)	33	33	33
15,0 (3,0)	54	44	44

Mutants Try⁺ apparus spontanément dans des boîtes de Petri enrichies avec des quantités croissantes de bouillon, en fonction du nombre de Try⁻ ensemencés.

des cellules mortes) se comportent à cet égard de la même manière : c'est ce qui ressort des tableaux I et II. Dans le cas des bactéries irradiées cependant, il se produit des prototrophes dont le nombre s'ajoute à celui des prototrophes formés au cours des divisions résiduelles. Pour évaluer le nombre Nr des Try⁺ effectivement induits, on admet que la probabilité de muter pour une bactérie à chaque division est la même, qu'il s'agisse d'une cellule irradiée et survivante mais non mutée ou d'une cellule non exposée.

Si *a* est le nombre des Try⁺ comptés dans les boîtes « enrichies » ensemencées avec des bactéries irradiées, et *b* celui des mutants apparus du fait des divisions résiduelles, on a :

$$\text{Nr} = a - b.$$

2° ENRICHISSEMENT ET INDUCTION DE TRY⁺ PAR LES RAYONS U. V., X ET α .

Des bactéries Try⁻ étant irradiées au moyen de rayons X ou U. V., on les étale dans des boîtes de Petri contenant du milieu synthétique enrichi de bouillon à concentrations croissantes.

TABLEAU II. — Croissance de bactéries Try⁻ irradiées ou non dans des boîtes de Petri enrichies de quantités croissantes de bouillon.

Enrichis- sement de bouillon peptone mis par boîte (cm ³)	Bactéries non irradiées		Bactéries irradiées aux rayons UV				Bactéries irradiées aux rayons X			
	(1)		(2)		(3)		(4)		(5)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0	6,7x10 ⁷	0	1,5x10 ⁸	0	1,5x10 ⁸	0	1,6x10 ⁸	0	1,3x10 ⁸	0
0,02	9,3x10 ⁷	0,5	7,0x10 ⁸	2,2	1,1x10 ⁸	-	2,5x10 ⁸	0,7	2,2x10 ⁸	0,7
0,05	1,3x10 ⁸	1,0	-----	-	1,7x10 ⁸	0,2	7,5x10 ⁸	2,2	2,9x10 ⁸	1,2
0,1	2,7x10 ⁸	2,0	1,8x10 ⁹	3,6	1,3x10 ⁹	3,1	5,9x10 ⁹	1,9	5,8x10 ⁹	2,2
0,2	5,6x10 ⁹	3,1	1,7x10 ⁹	3,5	1,2x10 ⁹	3,0	1,7x10 ⁹	3,4	1,1x10 ⁹	3,1
0,5	2,8x10 ⁹	5,4	4,5x10 ⁹	4,9	7,3x10 ⁹	5,6	2,9x10 ⁹	4,2	2,9x10 ⁹	4,5
1,0	4,0x10 ⁹	5,9	4,4x10 ⁹	6,2	3,8x10 ⁹	8,0	9,6x10 ⁹	5,9	3,3x10 ⁹	4,7
2,0	1,1x10 ¹⁰	7,9	-----	-	4,0x10 ⁹	8,1	2,0x10 ¹⁰	6,9	1,6x10 ¹⁰	6,9
3,0	1,5x10 ¹⁰	7,8	-----	-	5,7x10 ⁹	8,6	2,4x10 ¹⁰	7,2	3,1x10 ¹⁰	7,9

On étale dans des boîtes de Petri, enrichies de quantités variables de bouillon, des bactéries Try⁻ irradiées ou non (U. V., 700 ergs donnant une survie de 22 p. 100, et rayons X, 30 000 rads donnant une survie de 3,4 p. 100). On incube pendant dix heures, temps suffisant pour épuiser le bouillon. Puis on lave la surface des boîtes et on réétale sur gélose minimum et sur gélose additionnée de tryptophane, ce qui permet de connaître le nombre final de Try⁻. A : nombre d'auxotrophes. B : nombre de divisions.

a) Dans les 2 cas, la présence de bouillon augmente la fréquence des Try⁺ (tableau III) ; mais alors que cette augmentation se poursuit sans limite apparente avec les U. V. jusqu'à 3 p. 100 de bouillon au moins, pour les rayons X un plateau est atteint à partir de 0,2 p. 100 (fig. 1) ;

b) A survie comparable des Try⁻, la fréquence des Try⁺ induits par les rayons U. V. est très supérieure à celle des Try⁺ induits par les rayons X ;

c) L'effet de l'enrichissement en bouillon s'observe également avec les rayons α (tableau IV).

3° RELATION ENTRE LA DOSE ET LES EFFETS LÉTAL ET MUTAGÈNE.

a) *Effet létal.* — La courbe de survie des auxotrophes est exponentielle avec les rayons X (fig. 2) et α . Pour les premiers, la dose qui induit un événement létal de 10^4 rads environ.

TABLEAU III. — Action de l'enrichissement du milieu sur la fréquence des Try+ induits par les rayons X et U. V.

RAYONS U.V.				
1er étalement	Nombre de bactéries auxotrophes transplantées	2ème étalement	Nombre de colonies de bactéries auxotrophes obtenue par boîte	Fréquence de mutants pour 10 bactéries survivantes
MM + 5p.cent B.	$3,3 \times 10^7$	MM + 5p.cent B	617, 609.	180
MM + 5p.cent B.	$3,3 \times 10^7$	MM	587, 529.	165
MM	$2,6 \times 10^7$	MM	76, 74.	29
RAYONS X				
1er étalement	Nombre de bactéries auxotrophes transplantées	2ème étalement	Nombre de colonies de bactéries auxotrophes obtenue par boîte	Fréquence de mutants pour 10 bactéries survivantes
MM + 5p.cent B.	92×10^7	MM + 5 p.cent B	384, 333. 381, 347.	3,6
MM + 5p.cent B.	92×10^7	MM	270, 327. 276	3,2
MM	50×10^7	MM	56, 57. 54	1,1

Des bactéries Try— précultivées en bouillon sont irradiées puis étalées à la surface de boîtes de Petri contenant du milieu minimum (MM) additionné ou non de 5 p. 100 de bouillon (B). On incube pendant quatre-vingt-dix minutes (premier étalement), puis on lave la surface des boîtes et on rétale sur milieu minimum additionné ou non de 5 p. 100 de bouillon, on incube pendant quarante-huit heures à 37° C et on dénombre les Try+. Rayons U. V., 700 ergs. Rayons X, 20 000 rads.

Avec les U. V., la courbe de survie est sigmoïde. Elle témoigne d'une relation dose-effet de 5 à 10 coups (fig. 3). La dose qui correspond à un événement létal est ici de 300 ergs/mm⁻². Elle est estimée en traçant à partir de l'origine une droite parallèle à la portion rectiligne de la courbe et en mesurant sur elle la dose qui

correspond à l'ordonnée 0,37. Avec une telle exposition, la fraction des survivants dépasse 80 p. 100 ;

b) *Action mutagène.* — Les courbes de fréquence des mutants

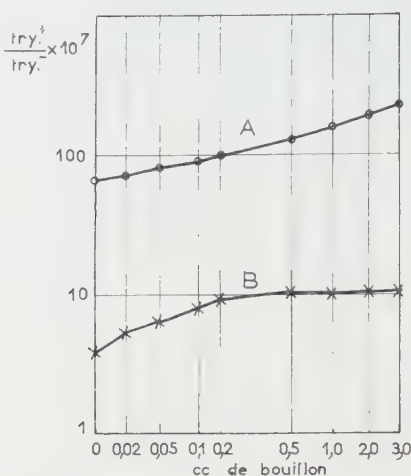


FIG. 1. — Effets du bouillon sur la fréquence des prototrophes induits par les rayons X et U. V. Courbe A : rayons U. V. (700 ergs) ; la survie des auxotrophes est de 26 p. 100. Courbe B : rayons X (20 000 rads) ; la survie des auxotrophes est de 11 p. 100. Ordonnée : fréquence des Try+ induits. Abscisse : volume pour 20 cm³ de milieu dans les boîtes de Petri.

TABLEAU IV. — Effet des acides aminés ajoutés au milieu minimum sur la fréquence des Try+ induits par les rayons α .

1er milieu (liquide)	Nombre de bactéries auxotrophes transplantées	2e milieu (solide)	Nombre de colonies de bactéries prototrophes obtenues par boîte	Fréquence de mutation pour 10 ⁷ bactéries survivantes
MM + AA + Tr	$7,0 \times 10^8$	MM	150, 133	2,3
MM	$5,2 \times 10^8$	MM	17, 12	0,3

Des bactéries Try— initialement cultivées en bouillon sont irradiées avec 5 000 rads de rayons α . On les resuspend ensuite pendant soixante minutes dans du milieu synthétique additionné ou non d'acides aminés (premier milieu). Puis on les étale sur milieu minimum (deuxième milieu). MM : milieu minimum. AA : acides aminés. Tr : tryptophane.

induits par les rayons X en fonction de la dose sont des droites

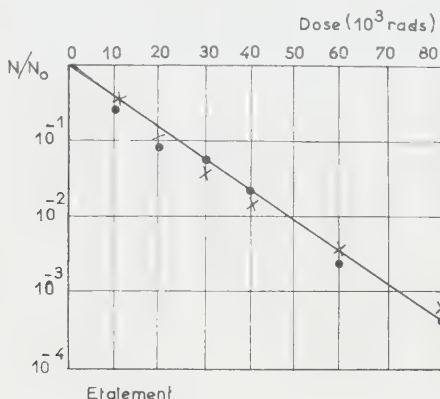


FIG. 2. — Courbe de survie d'*E. coli* B/r Try— à des doses croissantes de rayons X. Les bactéries sont étalées sur milieu synthétique additionné de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de tryptophane ou 5 p. 100 de bouillon. ●, + 5 p. 100 de bouillon; x, + tryptophane.

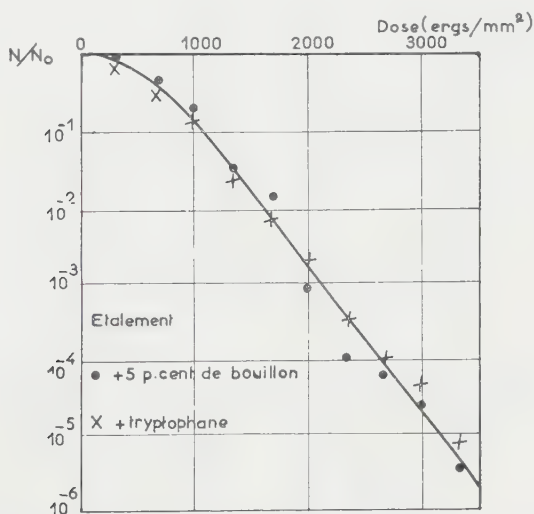


FIG. 3. — Courbe de survie d'*E. coli* B/r Try— aux rayons U. V. Les bactéries sont étalées sur milieu synthétique additionné de 5 p. 100 de bouillon (●) ou de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de tryptophane (x).

en coordonnées bilogarithmiques. En milieu minimum, la pente est égale à 1, témoignant d'un processus à 1 coup. En milieu enrichi, elle paraît légèrement supérieure à l'unité (fig. 4).

correspond à l'ordonnée 0,37. Avec une telle exposition, la fraction des survivants dépasse 80 p. 100 ;

b) *Action mutagène.* — Les courbes de fréquence des mutants

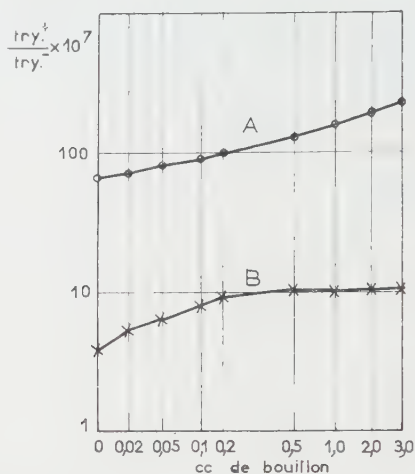


FIG. 1. — Effets du bouillon sur la fréquence des prototrophes induits par les rayons X et U. V. Courbe A : rayons U. V. (700 ergs) ; la survie des auxotrophes est de 26 p. 100. Courbe B : rayons X (20 000 rads) ; la survie des auxotrophes est de 11 p. 100. Ordonnée : fréquence des Try+ induits. Abscisse : volume pour 20 cm³ de milieu dans les boîtes de Petri.

TABLEAU IV. — Effet des acides aminés ajoutés au milieu minimum sur la fréquence des Try+ induits par les rayons α .

1er milieu (liquide)	Nombre de bactéries auxotrophes transplantées	2e milieu (solide)	Nombre de colonies de bactéries prototrophes obtenues par boîte	Fréquence de mutation pour 10 ⁸ bactéries survivantes
MM. + AA + Tr	$7,0 \times 10^8$	MM	150, 133	2,3
MM	$5,2 \times 10^8$	MM	17, 12	0,3

Des bactéries Try— initialement cultivées en bouillon sont irradiées avec 5 000 rads de rayons α . On les resuspend ensuite pendant soixante minutes dans du milieu synthétique additionné ou non d'acides aminés (premier milieu). Puis on les étale sur milieu minimum (deuxième milieu). MM : milieu minimum. AA : acides aminés. Tr : tryptophane.

induits par les rayons X en fonction de la dose sont des droites

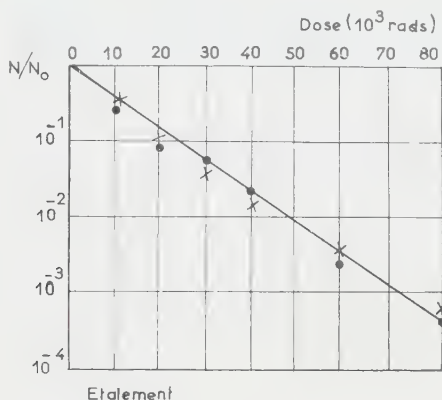


FIG. 2. — Courbe de survie d'*E. coli* B/r Try— à des doses croissantes de rayons X. Les bactéries sont étalées sur milieu synthétique additionné de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de tryptophane ou 5 p. 100 de bouillon. ●, + 5 p. 100 de bouillon; x, + tryptophane.

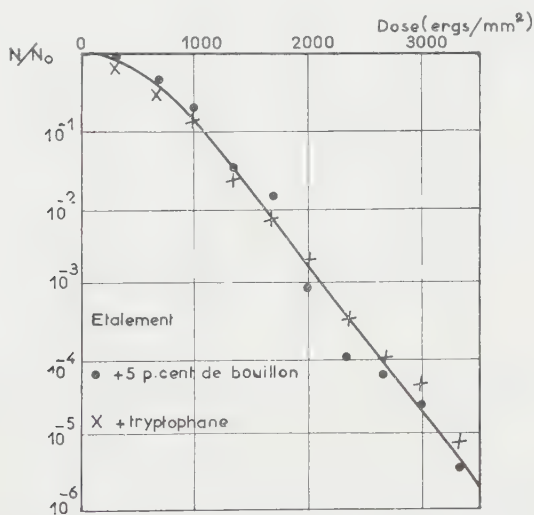


FIG. 3. — Courbe de survie d'*E. coli* B/r Try— aux rayons U. V. Les bactéries sont étalées sur milieu synthétique additionné de 5 p. 100 de bouillon (●) ou de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de tryptophane (x).

en coordonnées bilogarithmiques. En milieu minimum, la pente est égale à 1, témoignant d'un processus à 1 coup. En milieu enrichi, elle paraît légèrement supérieure à l'unité (fig. 4).

Avec les U. V., la fréquence des mutants croît avec la dose jusqu'à un maximum, vers $2\,200\text{ ergs/mm}^{-2}$, puis décroît. Ceci s'observe également pour les mutants « potentiels » et pour les mutants minimums, lesquels sont cinq à dix fois moins nombreux (fig. 5).

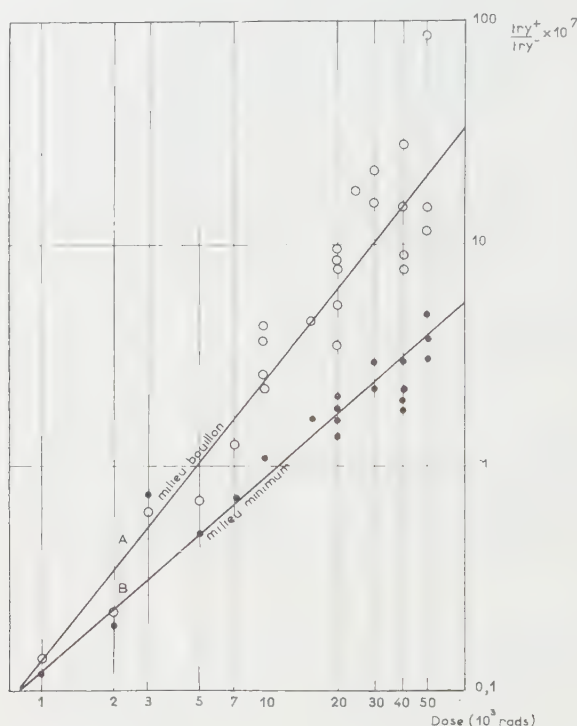


FIG. 4. — Relation entre la dose de rayons X et la fréquence des mutants Try+ « potentiels » et « minimums ». Coordonnées bilogarithmiques.

4° ACTION DE LA LUMIÈRE VISIBLE.

a) *Rayons U. V.* — On administre une dose de 700 ergs d'U. V. , puis on illumine à doses croissantes, la suspension préalablement lavée (fig. 6). Pour des durées d'illumination supérieures à cinq minutes, il existe une action létale propre de la lumière sur les Try- non irradiés. Pour des expositions de durée moindre, il existe une restauration des Try- irradiés, croissant avec la dose et une diminution parallèle des mutants « minimums » et des mutants

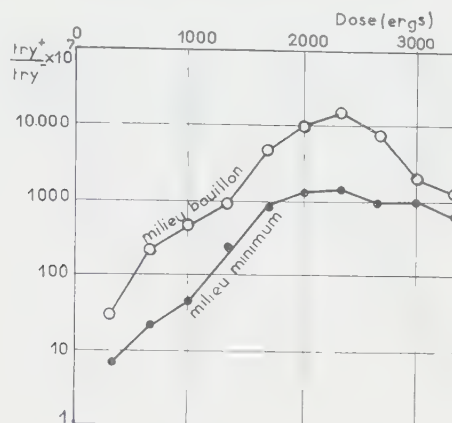


FIG. 5. — Relation entre la dose de rayons U. V. et la fréquence des mutants Try+ « potentiels » et « minimums ». Coordonnées semilogarithmiques.

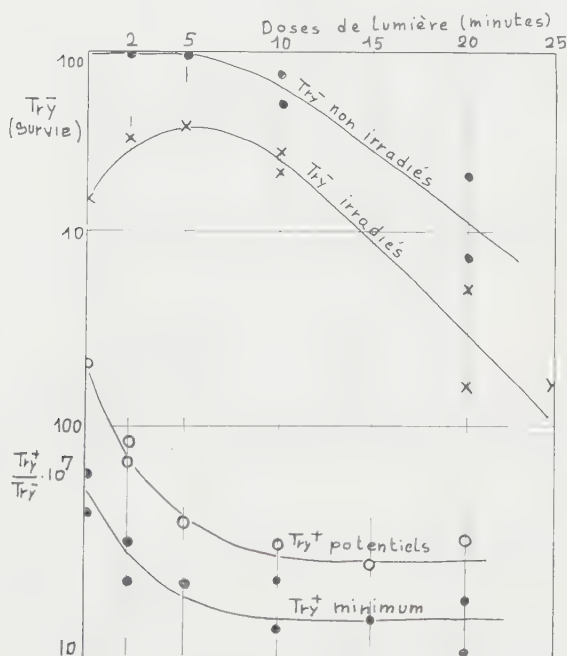


FIG. 6. — Action de doses croissantes de lumière visible sur la fréquence de mutants Try+ « enrichis » et « minimums », sur les auxotrophes irradiés et non irradiés. La dose d'U. V. est de 700 ergs/mm².

« enrichis ». Au-delà de cette durée, il n'existe pas d'effet de la lumière visible sur la fréquence des mutants.

Dans l'expérience de la figure 7, on a étudié l'effet d'une dose optimum de lumière visible sur des bactéries soumises à des doses croissantes de rayons U. V. La mortalité des Try⁻ est diminuée selon un facteur de réduction de dose de 1,3, ce qui est très inférieur

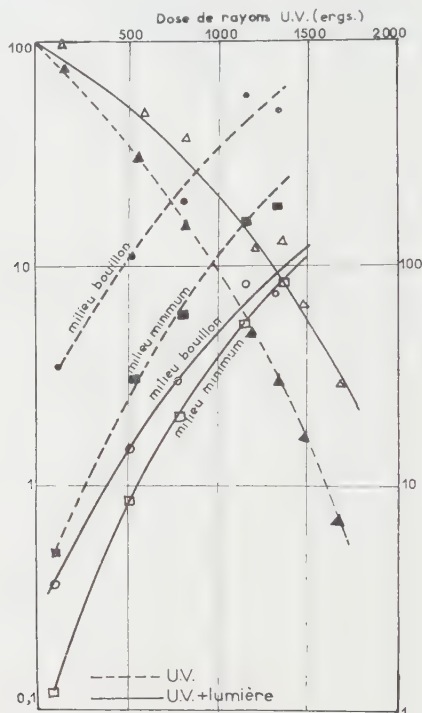


FIG. 7. — Action de la lumière visible sur la survie des auxotrophes (triangles clairs et foncés) et sur la fréquence des mutants Try⁺ induits par les U. V. Ordonnées de droite : Tr⁺ pour 10⁷ Try⁻ survivants.

à ce qui est habituellement observé chez B/r. Par ailleurs, la lumière exerce une action beaucoup plus marquée chez les mutants « potentiels » que chez les mutants « minimums ».

La réduction de la fréquence des mutants induits par l'irradiation s'observe pour des doses d'U. V. où la mortalité des Try⁻ est basse et pour lesquelles l'accroissement de la survie ne suffit pas à elle seule à expliquer la baisse de la fréquence des Try⁺. En outre, pour des doses de lumière supérieures à cinq minutes d'exposition, la fréquence des Try⁺ reste constante ; on en peut

conclure que la sensibilité des Try⁺ et des Try⁻ à l'effet létal de l'illumination est la même, et exclure ainsi la possibilité que la baisse du nombre des Try⁺ pour les faibles doses de lumière lui soit liée.

L'existence d'une photo-restauration de l'événement mutagène paraît donc certaine pour les deux catégories de mutants, « enrichis » et « minimums » ;

b) Rayons X. — Des expériences d'illumination ont été effectuées

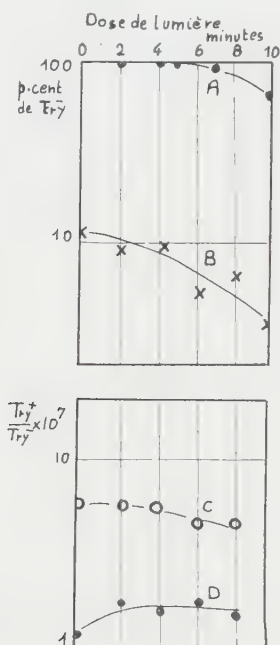


FIG. 8. — Action de la lumière visible sur les bactéries Try⁻ exposées à 15 000 rads de rayons X et sur la fréquence des Try⁺ induits. A : Try⁺ non irradiés. B : Try⁻ irradiés. C : Try⁺ « enrichis ». D : Try⁺ « minimums ».

chez des bactéries exposées aux rayons X. Aucune photo-restauration n'a été observée tant pour l'effet létal que pour l'action mutagène (fig. 8).

On pouvait se demander si cette absence de restaurabilité n'était pas liée à des lésions propres aux ionisations produites un peu partout dans la cellule. Pour contrôler cette hypothèse, des bactéries ont été préalablement exposées aux U. V., puis irradiées aux rayons X et finalement illuminées. La population des bactéries

survivantes a été restaurée comme si elle n'avait pas été soumise aux ionisations.

5° ETUDE DE LA PÉRIODE SENSIBLE A L'ENRICHISSEMENT.

a) *Contact avec des milieux enrichis.* — Il n'est pas nécessaire d'incuber les bactéries irradiées pendant de nombreuses heures en présence de bouillon ou d'acides aminés pour observer complètement l'effet de l'enrichissement. Il suffit que le contact ait lieu pendant une période sensible de l'ordre d'une heure (Witkin, 1956, *loc. cit.*).

Pour les rayons X comme pour les U. V., la durée de la période sensible est de l'ordre de soixante minutes. Ceci peut être étudié en étalant les bactéries traitées dans des boîtes de Petri contenant du milieu enrichi, en lavant la surface après des durées variables de séjour à 37° C, puis en réétalant sur milieu minimum.

Le même type d'expérience peut être effectué en milieu liquide enrichi de bouillon à partir duquel, après des séjours variables, on pratique les étalements sur milieu minimum. Les résultats sont représentés dans les figures 9, 10, 11 et 12.

On voit que :

1° Comme pour le milieu solide, le bouillon et les acides aminés accroissent la fréquence des mutants « potentiels ». Cependant, alors que pour les rayons X, il n'existe pas de différence entre les deux milieux, les acides aminés sont moins actifs que le bouillon dans le cas d'une irradiation U. V.

2° La durée de la période sensible est de soixante minutes pour les deux rayonnements, tandis que la latence imposée à la division des auxotrophes est un peu plus longue pour les U. V. que pour les rayons X. D'une façon constante, on observe au cours des deux premières heures une diminution du nombre des Try-.

3° A la fin de la période sensible, la fréquence des Try+ baisse car la vitesse de division des mutants est plus faible quand la croissance reprend que celle des auxotrophes.

On a constaté, en outre, que le bouillon et les acides aminés sont moins efficaces en milieu liquide qu'en milieu solide. On peut y remédier si on ajoute au milieu liquide du tryptophane.

De la catalase ajoutée dans le milieu ne remplace pas le bouillon. On écarte ainsi l'éventualité, d'ailleurs assez peu probable *a priori*, que le bouillon permettrait l'expression des mutants « potentiels » en neutralisant les peroxydes formés au cours de l'irradiation (fig. 10).

b) *Contact avec des milieux minimums.* — Les expériences consistent à incuber les bactéries pendant des temps variables en milieu minimum, puis à les étaler en milieu enrichi.

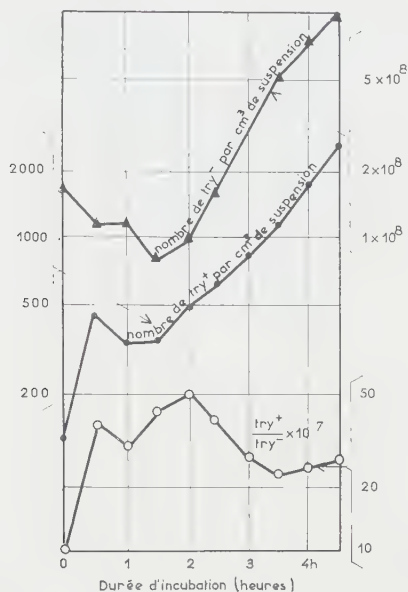


FIG. 9. — Effet sur la fréquence des *Try+* induits par 700 ergs d'U. V. d'une incubation de durée variable en milieu minimum liquide additionné des 17 acides aminés (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$) et de 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de tryptophane. On a représenté les courbes de croissance de la population des *Try-*.

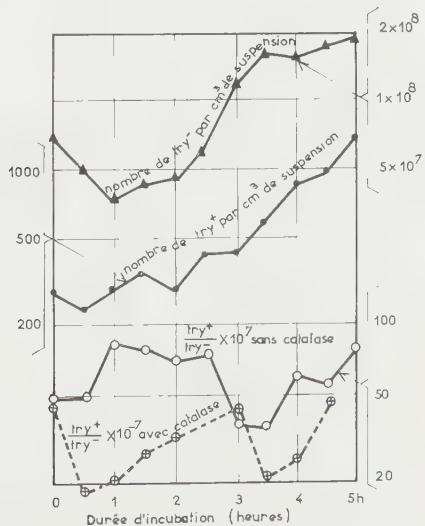


FIG. 10. — Mêmes données que l'expérience figure 9. L'enrichissement est ici du bouillon à 5 p. 100.

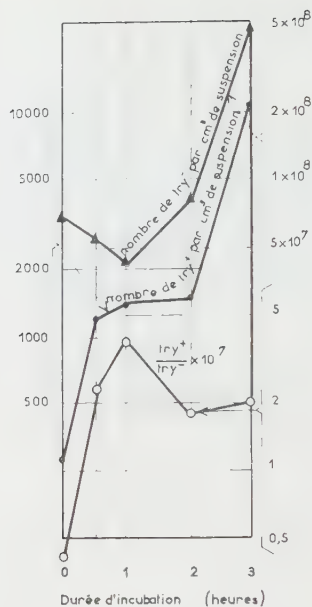


FIG. 11. — Expérience analogue à celle de la figure 9. Les bactéries sont exposées à 20 000 rads de rayons X. La survie est de 35 p. 100. Enrichissement en acides aminés.

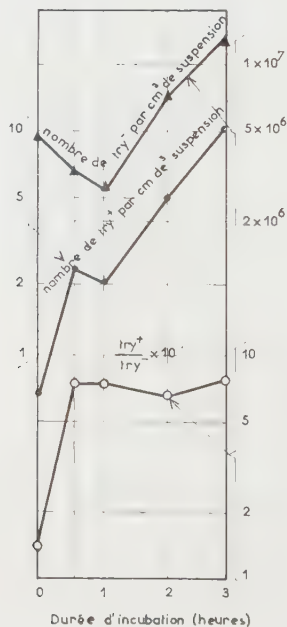


FIG. 12. — Expérience analogue à celle de la figure 10. Irradiation avec 20 000 rads de rayons X et enrichissement avec 5 p. 100 de bouillon.

On trouve que la fréquence des mutants enrichis baisse pendant quatre-vingt-dix minutes, puis reste constante. Le séjour en milieu minimum n'efface pas la totalité des mutants enrichis. Cet effet

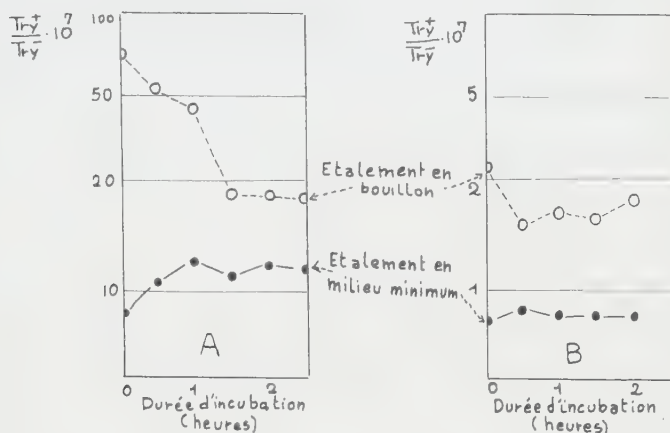


FIG. 13. — Effet sur les bactéries irradiées de l'incubation en milieu minimum pendant la période sensible. A : rayons U. V., 700 ergs/mm². B : rayons X, 20 000 rads.

est beaucoup moins sensible avec les rayons X qu'avec les U. V. (fig. 13).

DISCUSSION.

1° On sait que près de la moitié de l'énergie dissipée par les rayons X dans un milieu biologique consiste en des excitations. Bien que très semblables à celles produites par les U. V. par leur nature, elles s'en distinguent fondamentalement à cause de leur répartition.

Contrairement aux « excitations U. V. », qui se produisent surtout dans des molécules chromophores, celles dues aux rayons X se répartissent au hasard.

Puisqu'il a été constaté que l'expression de mutants induits par les rayons X comme ceux induits par les U. V. est sensible à l'enrichissement par du bouillon ou des acides aminés, la question se posait de savoir si, dans les deux cas, les excitations et non les ionisations seraient la cause des mutations. La similitude de la durée des périodes sensibles, la faible efficacité mutagène relative des rayons X, si on prend pour terme de comparaison des doses qui donnent des effets létaux comparables, plaident en faveur de cette possibilité ; mais la photo-restaurabilité du seul

effet mutagène des U. V. est un argument décisif contre cette interprétation.

A partir d'effets primaires différents se produisent des réactions influencées par les mêmes facteurs qui aboutissent à la mutation Try⁺. Il existe donc un point de convergence qui doit être très précoce puisque la durée des périodes sensibles est semblable.

2° On a vu que l'enrichissement du milieu d'incubation après l'irradiation n'a pas d'effets visibles sur la létalité, qu'il s'agisse des rayons X ou U. V. Une différence existe donc avec l'effet mutagène. On peut en conclure que si l'enrichissement a pour conséquence de réparer des lésions satellites dont la permanence tuerait les bactéries mutées, ces lésions sont étroitement spécifiques de la mutagénèse.

3° La dose de rayons X qui produit, en moyenne, un événement mutagène par bactérie peut être estimée à 10^{11} rads pour les mutants « minimums » et à $3 \cdot 10^{11}$ rads pour les « potentiels ».

Ces doses correspondraient à des cibles très petites, car celles-ci seraient constituées respectivement par une dizaine et une trentaine d'atomes. Leur réalité en est rendue douteuse.

En raison de l'extrême petitesse des cibles calculées, et du fait que leur « dimension » peut être modifiée par l'enrichissement, il est peu probable qu'on ait affaire à une structure définie. On peut plutôt penser que l'événement mutagène serait plus fréquent qu'il ne semble et que sa probabilité d'apparition serait tributaire de facteurs métaboliques sous la dépendance de l'enrichissement.

Il est intéressant de constater que, dans le cas de mutants résistants au phage T1, Demerec et Latarjet (1946, *loc. cit.*) ont observé une radiosensibilité de l'effet mutagène analogue à celle de la mutation Try⁻ — Try⁺ étudiée ici.

4° Connaissant les doses qui correspondent, en moyenne, à un événement létal ou mutagène par bactérie, on peut estimer les énergies dissipées par chaque rayonnement et les comparer.

a) *Effet létal.* — La dose 37 p. 100 de survie aux rayons X est d'environ 10^4 rads et aux U. V. de l'ordre de 300 ergs/mm². En supposant que seuls sont intéressés les acides nucléiques, on a $1,3 \cdot 10^6$ ergs/cm³ pour les rayons X et $1,8 \cdot 10^9$ ergs/cm³ pour les U. V. (on prend pour valeur du coefficient d'absorption pour l'acide nucléique bactérien $6 \cdot 10^4$ cm⁻¹ (Latarjet et coll., 1959). Les rayons X seraient près de 10^3 fois plus efficaces que les U. V. ;

b) *Effet mutagène.* — Le même raisonnement conduit aux valeurs de $1,3 \cdot 10^{13}$ ergs/cm³ pour les rayons X et $1,7 \cdot 10^{10}$ ergs/cm³ pour les U. V. Ici, l'efficacité des rayons X est près de 10^3 fois moindre que celle des rayons U. V.

Ce résultat est assez inattendu ; c'est l'inverse de ce que l'on

observe par ailleurs, comme par exemple dans le système lysogène d'*Escherichia coli* K12 à produire du phage (Marcovich, 1956) où rayons X sont plus efficaces qu'U. V. Il peut s'expliquer si l'on suppose que les ionisations produisent des lésions étendues, telles que des ruptures de macromolécules, et que les excitations ne font qu'augmenter temporairement et de façon localisée la réactivité chimique de certains groupes d'atomes.

Puisque la mort d'une cellule peut être la conséquence de lésions très diverses et que probablement elle résulte, dans le cas des ionisations, d'une désorganisation structurale par rupture de liaisons chimiques, on conçoit que pour la létalité les rayons X soient beaucoup plus efficaces que les rayons U. V.

Par ailleurs, une colonie mutante ne saurait se former si l'événement mutagène s'accompagne de lésions qui entravent la division cellulaire. Par conséquent si, en même temps que l'événement mutagène est induit par les rayons X, la probabilité de rompre une structure essentielle est grande, une partie importante de l'effet génétique risque d'être perdu ; ce ne serait pas le cas des rayons U. V., pour lesquels l'événement mutagène ne serait pas associé à des lésions aussi graves.

RÉSUMÉ.

1° Parmi les mutants Try⁺ induits par les rayons X et les rayons α , une certaine proportion n'apparaît qu'en présence d'une faible quantité de bouillon ajouté au milieu synthétique de base. Ce résultat est superposable à celui observé par Witkin avec les rayons U. V.

2° La durée de la période sensible au bouillon est comparable pour les deux rayonnements.

3° La mutabilité induite par les rayons U. V. est restaurable par la lumière visible. Elle ne l'est pas pour les rayons X.

4° Les rayons X sont énergétiquement près de mille fois plus efficaces que les U. V. pour tuer les bactéries, et près de mille fois moins efficaces pour induire les mutants Try⁺.

SUMMARY

COMPARISON OF PROTOTROPH MUTANTS INDUCED BY X AND U. V. RAYS IN *E. coli* B/r Try⁻.

Among the X and α rays induced prototrophs in a tryptophane requiring strain of *E. coli* B/r grown in broth, some (potential mutants) are not expressed in minimal agar. Broth is needed as it is for U. V. induction.

The length of the period during which broth must be present for optimal expression is about one hour in every case.

The potential mutants induced by U. V. are lost if the irradiated bacteria are maintained one hour in a minimal medium before plating in a broth containing one. This effect is very small with ionizing radiations.

U. V. but not X-rays induced mutability is restorable by visible light.

X-rays are energetically about 1 000 times more efficient than U. V. for killing the bacteria, but 1 000 times less efficient for inducing mutations.

★★

Nous tenons à adresser nos remerciements à M. le Dr R. Latarjet pour les suggestions et les critiques auxquelles il a soumis ce travail, M. Kin Sop Chong qui a participé à quelques expériences avec les rayons X, M^{me} Jouanneau pour sa collaboration technique, et M. Palaysi qui a assuré le fonctionnement des appareils de rayons X.

BIBLIOGRAPHIE

- BARON (L. S.), SPIEGELMAN (S.) et QUASTLER (H. J.). *J. gen. Physiol.*, 1953, **36**, 631.
DEMEREZ (M.) et LATARJET (R.). *Cold Spring Harbor Symp. on quant. Biol.*, 1946, **11**, 38.
LATARJET (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 174.
LATARJET (R.) et MULETIC (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 205.
LATARJET (R.), EPHRUSSI-TAYLOR (H.) et REBEYROTTE (N.). *Radiation Res.*, 1959, Suppl. 1, 417.
MARCOVICH (H.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 303.
MARCOVICH (H.). *Thèse Fac. Sci.*, Paris, 1957.
WITKIN (E.). *Cold Spring Harbor Symp. on quant. Biol.*, 1956, **21**, 123.
-

**ACTIVITÉ ANTITUBERCULEUSE EXPÉRIMENTALE
DE DEUX DÉRIVÉS DE PHÉNAZINE PIGMENTÉE
(B 663 et B 720) [*]
SEULS ET ASSOCIÉS A D'AUTRES ANTITUBERCULEUX
(ISONIAZIDE ET ÉTHIONIAMIDE)**

par Françoise GRUMBACH (**)
(avec la collaboration technique de Sabine CLAVEL).

(Institut Pasteur, Service de la Tuberculose)

Barry et ses collaborateurs ont décrit la préparation, les propriétés antituberculeuses et pharmacologiques d'une série de phénazines pigmentées [1, 2, 3, 4] les « Rimino-compounds ».

L'activité antituberculeuse de l'un de ces « rimino-compounds », le B 663, supérieure à celle de tous les autres dérivés, a été plus particulièrement étudiée par ces auteurs et par d'autres, chez la souris [1 à 6], le cobaye [1, 7, 16], le hamster [7] et le singe [8].

Ce composé est un produit coloré qui s'accumule après ingestion buccale dans les tissus des animaux sous forme de cristaux et dans les graisses où il est solubilisé. D'après Barry [4] il est très peu soluble dans l'eau (environ 1 µg/ml), soluble dans le benzène (10 p. 100) et dans l'huile d'olive (0,7 p. 100) ; c'est un composé « lipophile ».

Cette propriété de s'accumuler dans les tissus a été utilisée par Barry, Hirsch, Noufflard, pour obtenir une action thérapeutique prolongée chez les animaux tuberculeux même après une administration de très courte durée ou des traitements discontinus, ce qui a amené à conclure à l'avantage du B 663 sur l'isoniazide dans ce genre de traitement.

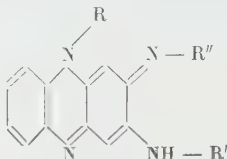
A côté de ce B 663, un autre composé, le B 720 a une activité antituberculeuse *in vitro* très semblable à celle du B 663, mais

(*) Nous remercions M. le Professeur Barry de nous avoir confié ces corps pour cette étude expérimentale.

(**) Manuscrit reçu le 24 mai 1960.

Barry [3] considère ce B 720 comme un composé « hydrophile », car il est cinquante fois plus soluble dans l'eau que le B 663 (ce qui ne représente pas encore une très grande solubilité) et, de ce fait, il ne s'accumule pas dans le tissu adipeux des animaux, mais s'accumule dans les organes. Ces composés correspondent aux formules suivantes :

Formule générale des "Rimino-Compounds"



Etant donné les différentes propriétés de ces deux composés, auront-ils dans les tissus des animaux tuberculeux des activités antibacillaires différentes ? C'est pour essayer de répondre à ces questions que nous avons été amenées à faire une étude expérimentale comparative de ces deux médicaments, nous préoccupant essentiellement de leur activité thérapeutique sur la tuberculose de la souris.

Notre objectif était la guérison de la tuberculose de la souris par l'une ou l'autre de ces phénazines ou par les deux, en traitement abortif et en traitement curatif, employées seules ou associées à l'isoniazide (INH) ou l'éthioniamide (1314 Th). Ces associations peuvent-elles améliorer les effets thérapeutiques de l'INH seul et du 1314 Th seul, en particulier en empêchant l'apparition de bacilles résistants à ces médicaments ?

D'autre part, nous avons recherché si des bacilles résistants à ces deux phénazines pouvaient apparaître lorsqu'on les employait seules, malgré le comportement très particulier de ces corps dans l'organisme des animaux, en particulier du fait de leur accumulation et des taux élevés de concentration dans les tissus. Les différents auteurs qui ont étudié l'action du B 663 chez la souris et chez le cobaye n'ont pas obtenu jusqu'à présent de bacilles résistants au B 663 ; seul Schmidt [8], chez le singe traité par de grosses doses de B 663 (100 mg/kg), a isolé des bacilles résistants au B 663, chez 13 singes sur 20 traités pendant six mois.

Nous avons utilisé la technique que nous avons préconisée antérieurement [9] pour obtenir chez la souris tuberculeuse le développement des bacilles résistants aux antibiotiques : traitement curatif commencé au quatorzième jour de l'infection, prolongé au moins deux mois et titrage *direct* des bacilles sur milieu solide de Jensen

imprégné d'antibiotique à partir des organes des animaux traités. Nous avons obtenu, comme avec tous les antibiotiques actifs sur la tuberculose de la souris, employés seuls, des bacilles résistants au B 663.

I. — ACTIVITÉ ANTITUBERCULEUSE « IN VITRO » DU B 663 ET DU B 720.

Ces produits très insolubles sont dissous dans l'alcool absolu ou dans le méthylcellosolve (2-méthoxyéthanol) à la concentration de 500 μg par millilitre ; les dilutions ultérieures sont faites dans l'eau bidistillée pour être réparties dans le milieu de culture liquide de Youmans au sérum de bœuf et titrées vis-à-vis de la souche humaine H37Rv (0,01 mg). Les résultats furent identiques pour les deux drogues : au sixième jour de culture à 37°, l'inhibition a lieu pour 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ et au douzième jour pour 0,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de B 663 ou de B 720. L'activité antituberculeuse est la même sur les souches résistantes à l'isoniazide, à la streptomycine et à l'éthioniamide. De plus, toutes les souches atypiques « photochromogènes » et « non photochromogènes » que nous avons étudiées sont sensibles au B 663 aux mêmes concentrations que la souche H37Rv.

Si l'on ajoute du B 663 ou du B 720 à une culture en milieu liquide de H37Rv de deux jours en pleine croissance, à la dose de 1 ou de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, on n'observe pas de disparition de l'acido-résistance des bacilles comme nous l'avons observé avec l'isoniazide [40] et l'éthioniamide [41]. Par contre, si on ajoute le B 663 en même temps que l'isoniazide dans les mêmes conditions, l'isoniazide ne provoque plus la disparition de l'acido-résistance des bacilles. Il en est de même lorsqu'on ajoute simultanément la streptomycine et l'isoniazide [40].

In vitro, par des passages successifs en milieu liquide contenant des doses croissantes d'antibiotiques, il est plus difficile d'obtenir des bacilles résistants au B 663 qu'à l'isoniazide. Cependant, en ensemençant à chaque passage une forte dose (0,1 mg) de bacilles en milieu liquide de Youmans, nous obtenons des colonies résistantes jusque dans les tubes contenant 5 ou 10 μg de B 663 par millilitre. Ces colonies apparaissent sous forme de grains dans un milieu limpide. Ces grains sont colorés en rouge comme si les bacilles fixaient le B 663 du milieu de culture. Par des passages successifs de ces grains dans le milieu de Youmans contenant des doses croissantes de B 663, on obtient des cultures dont tous les bacilles sont résistants à 5 ou 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de B 663. Au-delà de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, nous n'avons jamais pu obtenir de culture, ni même de colonies isolées.

II. — TOXICITÉ — FIXATION DANS LES TISSUS.

La limite de toxicité de ces phénazines n'a pas pu être atteinte. En effet, les souris supportent sans réaction 50 mg par souris *per os* en une seule fois (2 500 mg/kg) de B 663 ou de B 720 et un traitement de 1 mg par souris par jour (50 mg/kg) pendant trois mois. Les tissus se colorent après une seule prise de médicament (50 mg par souris). La coloration n'est pas la même avec les deux produits : tandis qu'avec le B 663, les tissus sont colorés en rouge brique et le tissu adipeux en jaune orangé plus ou moins foncé suivant la dose administrée, avec le B 720 les tissus sont beaucoup plus rose orangé et le tissu adipeux n'est pas coloré. Le B 663 s'accumule sous forme de cristaux en aiguilles rouge foncé qu'on retrouve sur les frottis de rate, de foie, de poumon (à conditions de n'y déposer ni alcool, ni huile, ni glycérine qui dissolvent les cristaux), mais dans le tissu adipeux il n'y a pas de cristaux, le B 663 est dissous dans la graisse. Avec le B 720, on ne trouve pas de cristaux sur les frottis d'organes, mais des grains cocciformes rouge foncé. Ces deux produits se déposent donc et s'accumulent dans les organes des animaux mais sous des formes différentes. Les macrophages sont bourrés de cristaux et la quantité de cristaux extracellulaires que l'on trouve sur les frottis d'organes proviennent très probablement de l'éclatement des macrophages qui libèrent ces cristaux dans les organes, ce qui provoque l'accumulation du médicament. Ce phénomène de la cristallisation a été fort bien étudié par Barry [4] qui en donne différentes explications.

La coloration des tissus persiste très longtemps, sa durée est en rapport avec la dose ingérée et la durée du traitement comme si les cristaux accumulés se dissolvaient très lentement dans les tissus ; après la cessation du traitement, ils disparaissent avec la coloration et ne laissent aucune trace lésionnelle.

L'étude histologique des organes des animaux traités pendant trois mois à la dose de 1 mg par souris, par jour (50 mg/kg), ne révèle aucune altération tissulaire malgré la présence de nombreux cristaux (visibles sur frottis d'organes).

Des dosages de B 663 dans les organes de souris (1) échelonnés du deuxième au soixantième jour du traitement par 1 mg de B 663 par jour et par souris, et après arrêt du traitement, nous

(1) Le B 663 est extrait des organes par l'alcool absolu. Les organes, pesés, sont immergés et broyés dans un volume fixe d'alcool absolu et après vingt-quatre heures de contact, on apprécie la concentration de B 663 en diluant les extraits dans l'alcool par comparaison avec une échelle colorée faite avec des doses connues de B 663 dans l'alcool.

montrent que les doses de B 663 augmentent au fur et à mesure de la poursuite du traitement et s'accumulent dans les organes (tableau I). Des doses élevées persistent longtemps même après l'arrêt du traitement. Les concentrations, calculées en μg par

TABLEAU I. — Concentration de B 663 dans les organes de souris non tuberculeuses recevant 1 mg par jour de B 663 (*per os*). Moyenne de 2 souris chaque jour (en μg par gramme d'organe).

Durée du traitement	Poumon	Rate	Foie	Rein	Tissu adipeux
2 jours	26	15	32	20	45
4 jours	30	30	37	29	100
7 jours	42	100	63	45	200
12 jours	59	90	74	67	320
18 jours	66	84	63	56	375
30 jours	190	1200	145	130	500
60 jours	567	10000	2300	112	680
60 jours + 19 jours sans trait ^t .	725	7300	263	47	217

gramme d'organe, montrent que la rate est l'organe où l'accumulation du B 663 est la plus grande et le rein, la plus faible. Après l'arrêt du traitement, les concentrations baissent dans tous les organes, beaucoup plus rapidement dans le foie que dans la rate et le poumon. Et ces chiffres sont en rapport avec la quantité de cristaux de B 663 visibles sur frottis de ces organes ; c'est dans la rate également qu'on voit la densité la plus grande en cristaux, tandis que dans le rein, les cristaux sont rares.

Chez la souris tuberculeuse, traitée à partir du quatorzième jour après l'inoculation, au moment où existent déjà des lésions tuberculeuses visibles sur le poumon sous forme de fines granulations grises saillantes, on peut constater que le B 663, administré par voie buccale, s'accumule électivement au niveau de ces lésions et, par conséquent, au niveau des bacilles, car c'est principalement au sein de ces petits nodules pulmonaires que les bacilles se multiplient, comme il est facile de le constater sur des coupes histologiques.

Après trente à soixante jours de traitement, l'accumulation du B 663 au niveau des nodules pulmonaires donne au poumon un aspect très particulier ; le parenchyme reste rose avec de nombreuses granulations noirâtres plus ou moins fines contenant des cristaux de B 663 qu'on retrouve sur frottis. Acharya, Robson et Sullivan [42] étudiant l'action du B 663 sur les lésions tubercu-

leuses de la cornée de la souris, ont également observé une coloration brun foncé au niveau des lésions avec accumulation de granules bruns de différentes tailles dans les macrophages périphériques de la lésion.

III. — ACTIVITÉ ANTITUBERCULEUSE « IN VIVO » CHEZ LA SOURIS

1° Traitements abortifs par le B 663 et le B 720.

Des souris blanches (souche Mec-L de l'Institut Pasteur) sont inoculées par voie veineuse avec 0,1 mg de la souche humaine H37Rv dont la virulence pour la souris est entretenue par des passages successifs sur la souris ; elles sont traitées dès le lendemain de l'inoculation, tous les jours (sauf le dimanche) par

TABLEAU II. — Traitements abortifs de la tuberculose de la souris.

Médicaments	Dose par jour et par souris	Mortalité au 22ème jour	Indice lésionnel moyen
B 663	0,1 mg per os	0/6	2
	0,2 mg per os	0/6	0,8
	0,2 mg s-c	0/6	3,5
	0,4 mg per os	0/6	0
	1 mg per os 1 mg s-c	0/6 0/6	0 2
B 720	0,1 mg per os	0/6	3
	0,2 mg per os	0/6	0,6
	0,4 mg per os	0/6	0,1
	1 mg per os	0/6	0
INH	0,025 mg per os ou s-c	0/6	0,3
Témoins	0	4/6	4

voie buccale à la sonde œsophagienne avec une suspension en eau gélosée de B 663 finement broyée, et sacrifiées quand 50 p. 100 des témoins sont morts, c'est-à-dire vingt à vingt-cinq jours après l'inoculation. On apprécie la gravité et l'étendue des lésions pulmonaires par un indice lésionnel (de 0 à 4) attribué à chaque souris.

Des traitements par voie sous-cutanée ont également été faits avec le B 663 en suspension dans l'eau gélatinée.

Les résultats sont consignés dans le tableau II.

Comme on peut le voir sur ce tableau, ces deux phénazines sont actives par voie buccale sur la tuberculose expérimentale de la souris en traitement abortif commencé dès le lendemain de l'inoculation à la même dose de 0,2 mg par souris par jour.

Par contre, la voie sous-cutanée est à déconseiller car le B 663 perd son activité, il est dix fois moins actif que par voie orale, le médicament semble ne pas être absorbé par cette voie. De même, si le B 663 est solubilisé en huile d'olive et donné par voie orale à la même dose qu'en suspension en gélose (0,1 et 0,2 mg par souris par jour) il est beaucoup moins actif qu'en suspension en gélose. D'autre part, solubilisé dans le méthylcellosolve (2-méthoxyéthanol) dans lequel il est relativement soluble (1 g pour 100 ml) et donné par voie orale, il est plus actif qu'en suspension, mais le méthylcellosolve seul, même dilué au 1/8, est toxique et quelques souris meurent de toxicité du solvant au cours du traitement.

Par conséquent, le solvant qu'on emploie pour l'administration de ce médicament peut modifier de façon importante l'activité antituberculeuse du médicament.

Dans toutes nos expériences le B 663 a toujours été employé en suspension en eau gélifiée et par voie orale, de même que le B 720.

2° Traitement curatifs.

Les animaux sont inoculés comme précédemment.

Le traitement commence seulement le quatorzième jour après l'inoculation et il est poursuivi pendant cent jours. Des animaux sont sacrifiés aux trentième, soixantième et centième jours de traitement pour faire par culture une numération des bacilles viables dans le poumon et titrer leur sensibilité aux médicaments. Le poumon entier est broyé au mortier, traité par 2 ml d'acide sulfurique à 4 p. 100 pendant dix minutes puis neutralisé par de la soude (environ 2 ml). Onensemence 0,1 ml de ce broyat par tube de Jensen, soit pur, soit dilué : 0,1 ml du broyat représente donc environ 1/40 de poumon.

Nous envisagerons isolément l'effet thérapeutique du B 663 pour le comparer ensuite à celui du B 720.

a) B 663 SEUL. — Le B 663 seul fut administré en traitement curatif aux doses de 0,1 mg, 0,2 mg, 0,5 mg et 1 mg par jour et par souris. Avec les plus faibles doses, 0,1 ou 0,2 mg, quelques souris de chaque lot ne réagissent pas immédiatement au traitement et meurent de tuberculose dans les huit premiers jours de traitement, presque en même temps que les témoins non traités (3 sur 6 avec 0,1 mg et 1 sur 6 avec 0,2 mg). Toutes ne sont pas

sauvées. Par la suite, celles qui ont survécu et réagi au traitement par les faibles doses (0,1 et 0,2 mg) survivent jusqu'à la fin de l'expérience (150 jours de traitement) et bénéficient du traitement. Barry et Hirsch avaient déjà remarqué qu'un certain nombre de souris meurent au début d'un traitement curatif, comme s'il fallait un traitement de plusieurs jours pour permettre au médicament de s'accumuler dans les organes et pour obtenir une concentration suffisante pour arrêter la multiplication des bacilles.

Il est manifeste que plus on augmente les doses de B 663, plus rapide et meilleur est l'effet thérapeutique.

Durant les trente premiers jours de traitement, à toutes les doses de B 663, l'effet thérapeutique est excellent, aussi bon que celui de l'INH ou du 1314 Th (tableau III). Toutes ces substances sont bactéricides.

TABLEAU III. — Traitements curatifs par différents antibiotiques employés seuls. Unités bacillaires pour 0,1 ml de broyat de poumon (1/40 de poumon).

MEDICAMENTS	JOURS DE TRAITEMENT			
Doses par jour et par souris (en mg)	0	32	63	106
B 663 0,5	1×10^7	1×10^4 6×10^4	$5,5 \times 10^3$ 3×10^4	6×10^4 5×10^1
B 663 1	1×10^7	4×10^3 3×10^4	9×10^3 $1,8 \times 10^3$	3×10^5
INH 0,1	1×10^7	$1,2 \times 10^4$ 5×10^4	$7,5 \times 10^3$ 2×10^4	$1,2 \times 10^4$ 1×10^5
1314 Th 1	1×10^7	1×10^4 1×10^5	$8,5 \times 10^3$ $1,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^4$ 4×10^5

Chez les animaux sacrifiés au trentième jour du traitement, on assiste, aussi bien avec le B 663 qu'avec l'INH ou le 1314 Th, à une chute spectaculaire du nombre des bacilles isolés du poumon, ce nombre passant de 10^7 à 10^3 ou 10^4 , et tous les bacilles sont restés sensibles aux médicaments.

Entre le trentième et le soixantième jour de traitement, un nouveau phénomène intervient qui vient interférer avec l'effet bactéricide observé les premiers trente jours. Chez les animaux

sacrifiés après soixante jours de traitement, le nombre total de bacilles isolés reste très voisin de celui trouvé au trentième jour de traitement, la courbe de bactéricidie tend à devenir horizon-

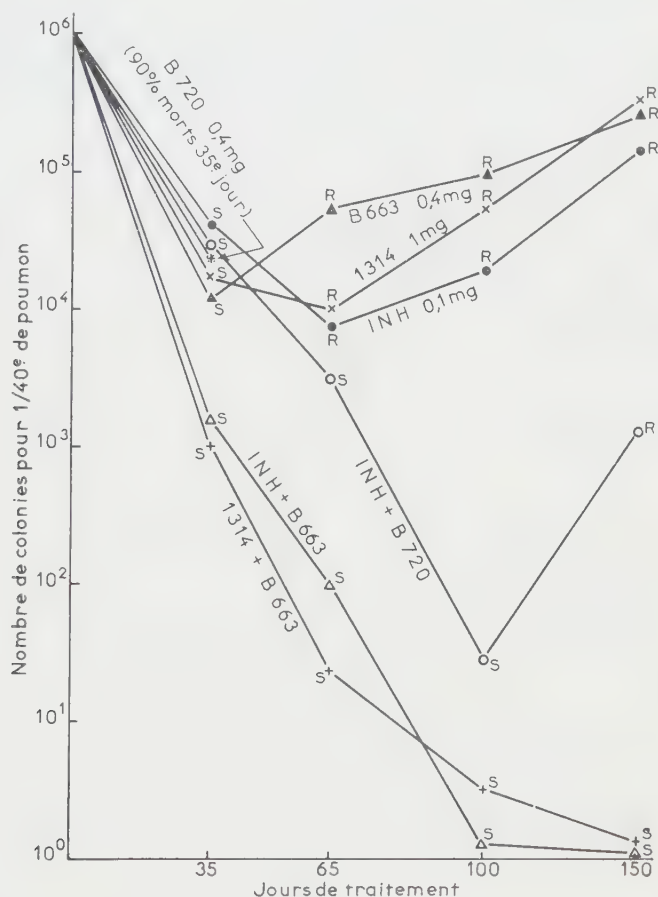


FIG. 1. — Traitement curatif de la tuberculose de la souris (quatorze jours après l'inoculation et pendant cent cinquante jours) par différents médicaments employés seuls ou en associations.

tale (fig. 1) et, de plus, parmi ces bacilles isolés, il apparaît un fort pourcentage de bacilles résistants. Si l'on continue le traitement au-delà du soixantième jour, on constate, chez les souris sacrifiées après cent jours de traitement, que le nombre de bacilles

isolés du poumon a encore augmenté (tableau III) et dans les souches isolées, le pourcentage de bacille résistants au B 663 a augmenté également par rapport à celui de la souche initiale, avant tout traitement.

La résistance au B 663 des bacilles isolés n'est pas homogène à un taux très élevé d'antibiotique (tableau IV) comme Schmidt l'a

TABLEAU IV. — Pourcentage de bacilles résistants au B 663 après cent jours de traitement curatif (titrage indirect en milieu liquide de Youmans).

Doses de B 663 en $\mu\text{g/ml}$	0,15	0,3	0,6	1,2	2,5	5
Avant traitement	25 %	5 %	1 %	0 %	0 %	0 %
<u>Animaux traités</u>						
B 663 0,2 mg	100	75	75	25	1	0
B 663 0,4 mg	100	100	75	50	1	0
	100	100	75	25	1	0
B 663 0,5 mg	100	100	75	75	50	0
	100	100	50	50	10	0

remarqué également [8]. Ce pourcentage est suffisamment élevé pour qu'on puisse parler de souches « résistantes au B 663 ». En effet, réinoculées à la souris et traitées par ce même antibiotique, ces souches exigent, en traitement abortif, des doses de B 663 cinq à dix fois plus élevées que la dose active sur la souche sensible, pour empêcher l'évolution de la maladie.

Le bacille tuberculeux se comporte donc chez la souris vis-à-vis du B 663 comme il se comporte vis-à-vis de l'INH et du 1314 Th : après une première phase de bactéricidie, des bacilles résistants apparaissent en nombre élevé au bout de deux mois de traitement et se multiplient malgré la continuation du traitement dont l'efficacité diminue.

b) ASSOCIATION DU B 663 A L'INH ET AU 1314 TH. — Dans la même expérience que celle qui vient d'être exposée, si on associe le B 663 (0,5 mg par souris) à l'INH (0,1 mg par souris) ou au 1314 Th (1 mg par souris), pendant les trente premiers jours de traitement, tout se passe comme avec les médicaments employés seuls (fig. 1), mais cependant, le nombre total de bacilles isolés a diminué plus rapidement. C'est entre le trentième et le soixantième jour de traitement qu'apparaît une grande différence entre

les résultats des traitements par un seul médicament et ceux des traitements associés. Avec les associations, la bactéricidie continue, le nombre des bacilles cultivables diminue régulièrement, les bacilles isolés restent *sensibles* aux médicaments associés, les mutants résistants n'apparaissent pas. Au centième jour de traitement, la culture des organes des souris traitées soit par l'association B 663 + INH soit par l'association B 663 + 1314 Th ne révèle que *quelques rares colonies bacillaires* (d'une à quatre et parfois zéro) dans le poumon, la rate ou le rein (tableau VI) et ces rares colonies sont sensibles aux antibiotiques : ce sont des « persistants sensibles ».

Si on arrête le traitement au bout de cent cinquante jours, et si on sacrifie les souris quarante-huit jours plus tard, le nombre de colonies isolées par culture des organes (poumon, rate ou rein) n'est pas supérieur à celui qui existait au moment de l'arrêt du traitement ; ces persistants sensibles ne semblent pas s'être multipliés, ils sont cependant viables et cultivables.

Il est possible que ce soit le B 663 accumulé dans les organes qui empêche ces bacilles de se multiplier pendant très longtemps après l'arrêt du traitement, sans cependant les tuer, du fait peut-être de leur état de latence.

En résumé, l'effet du B 663 seul, en traitement curatif chez la souris, est comparable à celui de l'isoniazide et de l'éthioniamide ; le B 663 est bactéricide ; mais après soixante jours de traitement, des mutants résistants apparaissent, le pourcentage de bacilles résistants par rapport aux bacilles sensibles augmente considérablement et, de ce fait, le nombre total de bacilles augmente malgré la continuation du traitement.

L'association du B 663 à l'INH ou au 1314 Th empêche l'apparition des bacilles résistants à l'INH, au 1314 Th et au B 663, le nombre de bacilles viables diminue régulièrement pour n'être plus que quelques unités de « persistants sensibles » au bout de cent jours de traitement, résultat remarquable dans la tuberculose de la souris.

L'examen histologique des organes de ces animaux traités pendant plus de trois mois par une des associations comprenant du B 663 confirme l'absence de toute lésion tuberculeuse et également l'absence de lésions toxiques.

Comme dans toutes les associations médicamenteuses, l'effet de l'association du B 663 à l'INH ne se manifeste réellement que tardivement (à partir du deuxième mois) au moment où, avec les médicaments employés seuls, l'apparition de la résistance empêche l'effet continu du médicament employé seul. Il est curieux que Robson, sur les lésions tuberculeuses de la cornée de

la souris, ait trouvé que l'association INH + B 663 ne semblait pas donner de meilleur résultat que l'INH seul.

c) COMPARAISON DE L'EFFET CURATIF DU B 663 ET DU B 720. — La technique est la même que dans l'expérience précédente.

Le B 663 et le B 720 sont administrés à la dose de 0,1, 0,2 et 0,4 mg par souris et par jour, l'INH à la dose de 0,1 mg. Les associations comportent ces mêmes doses de l'un ou l'autre dérivé de phénazine associées à 0,1 mg d'INH par jour et par souris.

1° *B 720 seul.* — En traitement curatif, le B 720 seul se comporte tout à fait différemment du B 663 ; en effet, malgré le traitement par le B 720, les animaux meurent de tuberculose, aucun n'est sauvé (tableau V).

TABLEAU V. — Activités comparées du B 663 et du B 720 en traitement curatif.

MEDICAMENTS	Doses par jour et par souris	Mortalité au 35ème jour de traitement
B 663	0,1 mg	3/6
	0,2 mg	1/6
	0,4 mg	0/12
B 720	0,1 mg	5/6
	0,2 mg	5/6
	0,4 mg	5/6
TEMOINS (6)	Tous morts en 18 à 21 jours après l'inoculation	

Les trois souris survivantes au trente-cinquième jour ont été sacrifiées très malades et présentaient des lésions tuberculeuses évolutives très étendues contenant de très nombreux bacilles.

Il ressort de ce tableau que le B 720, même à une dose quatre fois plus élevée que la dose minima active de B 663 (0,1 mg), prolonge seulement de quelques jours la survie des animaux par rapport aux témoins non traités, alors que dans l'expérience de traitement abortif, le B 720 s'est montré aussi actif que le B 663.

Il y a donc là une très grande différence dans l'activité anti-tuberculeuse du B 720 et du B 663.

2° *Association du B 720 à l'isoniazide.* — On pouvait espérer que, malgré son peu d'activité curative lorsqu'il est employé seul, le B 720 associé à l'INH pourrait empêcher l'apparition des

bacilles résistants à l'INH. Au cours du traitement par l'INH + B 720, on n'enregistre aucune mortalité, c'est le fait de l'INH. Quant au nombre absolu de bacilles isolés au cours du traitement, on verra (tableau VI) qu'à partir du soixantième jour, avec tous les traitements associés, même lorsqu'un des associés est le B 720, le nombre des bacilles isolés est toujours inférieur à celui obtenu à la suite du traitement par INH seul. Donc le B 720 n'est pas tout à fait sans effet. Mais si l'on compare l'association

TABLEAU VI. — Nombre de colonies isolées dans 0,1 ml de broyat de poumon (1/40 de poumon) au cours du traitement curatif par différentes associations médicamenteuses.

MEDICAMENTS	JOURS DE TRAITEMENT			
Doses par jour et par souris (en mg)	0	68	100	154
INH 0,1 seul	2×10^6	$1,2 \times 10^5$ 7×10^4	5×10^5 $2,5 \times 10^4$	8×10^6 $1,4 \times 10^6$ 6×10^5
INH 0,1 + B 663 0,1	2×10^6	7×10^3 9×10^3	1×1 0×1	$0,3 \times 1$ $0,3 \times 1$
INH 0,1 + B 663 0,2	2×10^6	$3,2 \times 10^2$ $1,8 \times 10^2$	0×1 0×1	0×1 $0,3 \times 1$
INH 0,1 + B 663 0,4	2×10^6	5×10^1 $1,8 \times 10^2$	2×1 $0,3 \times 1$	0×1 0×1
INH 0,1 + B 720 0,1	2×10^6	2×10^5	1×10^4	$1,3 \times 10^3$ $1,2 \times 10^3$ 3×10^3
INH 0,1 + B 720 0,2	2×10^6	1×10^5	5×10^4	3×10^2 9×10^3 $1,4 \times 10^4$
INH 0,1 + B 720 0,4	2×10^6	5×10^3	3×10^1	8×10^2 1×10^3

INH + B 720 à l'association INH + B 663, on se rend compte de l'énorme supériorité du B 663 qui s'affirme et se renforce au fur et à mesure de la prolongation du traitement, puisque déjà au centième jour de traitement par INH + B 663 même avec 0,1 mg de B 663 on isole moins d'une unité bacillaire dans 0,1 ml de broyat de poumon (fig. 1 et tableau VI), soit moins de 40 bacilles par organe.

La raison de l'insuccès du traitement par INH + B 720 tient à ce qu'un fort pourcentage de bacilles résistants à l'INH se développent malgré l'association avec le B 720 (tableau VII) du fait de la faible activité du B 720 (même à la dose de 0,4 mg) en traitement curatif.

De l'ensemble du tableau VII, il ressort que si des bacilles résistants à l'INH se développent en effet, malgré le traitement

TABLEAU VII. — Pourcentage de bacilles résistants à l'isoniazide (titrage direct du broyat de poumon sur milieu solide de Löwenstein-Jensen).

100 jours de traitement							
INH en µg/ml	0,05	0,1	0,2	0,5	1	10	25
INH 0,1 mg seul	100	100	100	50	50	50	
INH + B 720 0,1 mg	2	1	1	0,2	0,2	0	
INH + B 720 0,2 mg	0,1	0,1	0,1	0,05	0,05	0	
INH + B 720 0,4 mg	0	0	0	0	0	0	
154 jours de traitement							
INH 0,1 mg seul	100	100	100	50	30	30	30
	100	100	100	100	20	10	5
INH + B 720 0,1 mg	10	10	10	10	5	0	0
	5	4	3	0,3	0,3	0,2	0,2
	5	5	5	2	2	0,5	0,05
INH + B 720 0,2 mg	5	5	5	3	1	0,04	0,02
	80	80	50	30	10	1	0,1
	100	100	75	75	50	10	1
INH + B 720 0,4 mg	Titrage indirect en milieu de Youmans - Colonies résistantes à l'INH et au B 720						
Avant traitement							
0	0,01	0,0005	0	0	0	0	0

associé au B 720, ils apparaissent et se développent plus tardivement que ceux provenant des animaux traités par INH seul. En association avec l'INH l'augmentation de la dose de B 720 améliore tout de même l'effet thérapeutique de l'INH mais cette action, même à forte dose, n'est pas suffisante pour empêcher le développement des bacilles résistants à l'INH.

Si, après cent à cent cinquante-quatre jours de traitement, les souches isolées des animaux traités par l'isoniazide *seul* (à la dose de 0,1 mg par jour et par animal) présentent une résistance de tous leurs bacilles à 0,2 ou 0,5 µg par millilitre d'INH avec un fort pourcentage de bacilles résistants à 1, 10 et 25 µg par millilitre (tableau VII), par contre avec l'association du B 720 (aux doses de 0,1, 0,2 ou 0,4 mg par jour et par animal) à l'INH, les bacilles résistants à l'INH qui apparaissent ne se manifestent que plus tardivement qu'avec l'INH seul ; de plus, une résistance homogène à 0,05 ou 0,1 µg/ml d'INH est exceptionnelle et le pourcentage de bacilles résistants à 1, 10 ou 25 µg est beaucoup plus faible qu'après le traitement par l'INH employé seul ainsi que le nombre total de bacilles isolés.

On ne peut donc pas dire que l'association du B 720 à l'INH soit tout à fait inefficace. Cependant, le pourcentage de bacilles résistants à l'INH qui apparaissent dans ces souches isolées n'est pas négligeable (si on le compare à celui de la souche avant tout traitement) et ces souches peuvent être considérées comme des souches résistantes à l'INH.

Et si l'on envisage de poursuivre plus longtemps le traitement par INH + B 720, le développement de ces bacilles résistants ne peut avoir qu'un effet néfaste sur le résultat thérapeutique final puisque le nombre absolu des bacilles reste élevé dans le poumon et aura tendance à augmenter par suite de la multiplication des bacilles résistants.

En résumé, l'activité curative du B 720 employé seul ou en association avec l'INH est très faible puisque, employé seul, il n'arrête pas l'évolution de la tuberculose de la souris et, associé à l'INH, il n'évite pas l'apparition de bacilles résistants à l'INH, il n'a qu'un effet de retard sur le moment de l'apparition de ces bacilles résistants.

Ces résultats s'opposent aux excellents résultats obtenus avec l'association du B 663 à l'INH ; même à la dose de 0,1 ou 0,2 mg de B 663 associée à 0,1 mg d'INH, on a de très bons résultats thérapeutiques : empêchement total d'apparition de bacilles résistants, augmentation de l'action bactéricide de l'INH et les quelques rares colonies bacillaires isolées après cent et cent cinquante jours de traitement sont toutes sensibles à l'INH et au B 663, ce sont des « persistants sensibles ».

DISCUSSION

Deux phénazines pigmentées (B 663 et B 720) ayant même activité tuberculostatique *in vitro*, même activité thérapeutique en traitement abortif de la tuberculose de la souris, présentent de

grandes différences en traitement *curatif* de la tuberculose de la souris : le B 663 conserve la même activité qu'en traitement abortif, soit employé seul, soit en association avec l'INH ou le 1314 Th. Par contre, le B 720 perd la plus grande partie de son activité en traitement curatif, il n'arrête pas l'évolution de la tuberculose de la souris lorsqu'il est employé seul et il n'empêche pas l'apparition des bacilles résistants lorsqu'il est associé à l'INH.

C'est avec de tels faits qu'on doit se rendre compte de l'importance de l'épreuve du traitement curatif de la tuberculose de la souris dans l'étude d'un nouveau médicament antituberculeux. Cette épreuve a permis de différencier nettement deux médicaments dont l'activité antituberculeuse *in vitro* et en traitement abortif était la même.

Nous avons observé un phénomène analogue avec la « thiocarbaniline » qui est très active en traitement abortif et perd son activité en traitement curatif, employée seule ou associée à l'INH [13].

Comment peut-on expliquer cette différence d'activité des deux phénazines ? Probablement par une différence d'absorption.

D'après les travaux de Barry, après quatorze jours de traitement par le B 663 ou le B 720 à la même dose, les concentrations sanguines du B 720 sont trois fois plus faibles que celles du B 663, mais les concentrations dans les organes sont près de trois fois plus élevées dans le foie et le poumon avec le B 720 qu'avec le B 663.

Etant donné ce fait, on pourrait en déduire que le B 720 sera plus actif que le B 663. Or, il n'en est rien. C'est donc au niveau des cellules qu'il doit y avoir une différence de pénétration.

Dans les organes de la souris, au quatorzième jour après l'inoculation, au début du traitement curatif, les bacilles sont presque tous intracellulaires et les médicaments les plus actifs chez la souris sont ceux qui sont aussi actifs sur les bacilles intracellulaires que sur les bacilles en milieu de culture liquide. C'est ce qui se passe pour l'isoniazide [14] et pour l'éthioniamide [15].

Nous ne savons pas encore si le B 663 pénètre à l'intérieur des leucocytes mais tout le laisse supposer, étant donné en particulier les très bons résultats thérapeutiques obtenus chez la souris ; tandis que le B 720 y pénètre peut-être très mal, d'où sa très faible activité curative.

Le B 663 est un médicament très actif (même à faible dose : 5 à 10 mg/kg/souris/jour) en traitement curatif, employé seul et surtout en association, à ces faibles doses, avec l'isoniazide ou le 1314 Th. Chez la souris, les résultats thérapeutiques sont si brillants avec ce médicament, qu'il est à espérer qu'il puisse être utilisé en clinique humaine, de préférence en association avec l'INH ou le 1314 Th, à dose faible, pour renforcer leur action et empêcher

le développement de bacilles résistants. Jusqu'à présent, à notre connaissance, les quelques essais entrepris en clinique humaine avec le B 663 seul n'ont pas été couronnés de succès. De toutes façons, d'après nos résultats expérimentaux, il semble bien que le B 663 doive être préféré au B 720.

RÉSUMÉ

L'étude expérimentale sur la tuberculose de la souris de deux « Rimino compounds » B 663 et B 720 nous a donné les résultats suivants :

1° B 663 et B 720 ont la même activité antituberculeuse *in vitro* : 0,3 à 0,6 µg/ml.

2° B 663 et B 720 s'accumulent dans les organes de la souris sans provoquer de réactions de toxicité ni de lésions histologiques.

3° B 663 et B 720 ont la même activité *in vivo* en traitement *abortif* de la tuberculose de la souris (traitement commencé le lendemain de l'inoculation et poursuivi pendant vingt jours) : 0,1 à 0,2 mg par jour et par souris (5 à 10 mg/kg) par voie orale.

4° En traitement *curatif* de la tuberculose de la souris (traitement commencé le quatorzième jour après l'inoculation) on observe de très grandes différences d'activité entre ces deux médicaments.

a) Le B 663 employé *seul* est actif aux doses de 0,1, 0,2 et 0,4 mg par jour et par souris. Son action est très comparable à celle de l'INH et du 1314 Th : bactéricidie rapide et développement de bacilles résistants après deux mois de traitement. L'association du B 663 (à ces mêmes doses) à l'INH ou au 1314 Th augmente l'effet thérapeutique de ces médicaments non seulement en empêchant le développement de bacilles résistants, mais aussi en renforçant la bactéricidie, qui est telle qu'après trois mois de traitement les organes des animaux sacrifiés ne contiennent plus que quelques unités bacillaires cultivables qui sont des « persistants sensibles ».

b) Par contre, le B 720 employé *seul* ne confère aux souris que quelques jours de survie par rapport aux témoins, et *en association* avec l'INH, il n'améliore que très faiblement l'effet de l'INH employé seul et ne fait que retarder légèrement l'apparition des bacilles résistants à l'INH.

Le B 663 est donc un médicament antituberculeux bien supérieur au B 720 chez la souris. Et les excellents résultats expéri-

mentaux obtenus en particulier en association à faible dose avec d'autres antituberculeux actifs font souhaiter qu'on puisse utiliser ce B 663 en thérapeutique humaine.

SUMMARY

EXPERIMENTAL ANTI-TUBERCULOUS ACTIVITY OF TWO PIGMENTED PHENAZINE DERIVATIVES (B 663 and B 720), ALONE OR ASSOCIATED WITH OTHER ANTI-TUBERCULOUS DRUGS (ISONIAZID AND ETHIONIAMIDE).

The experimental study of two « Rimino compounds », B 663 and B 720, in mice tuberculosis yielded the following results.

1. B 663 and B 720 show the same *in vitro* anti-tuberculous activity : 0,3 to 0,6 µg/ml.

2. B 663 and B 720 accumulate in mice organs, without inducing toxicity reactions or histological lesions.

3. B 663 and B 720 show the same activity *in vivo* when applied as *abortive* treatment of mice tuberculosis (treatment started on the day after infection and prolonged 20 days) : 0,1 to 0,2 mg/day/mouse (5 to 10 mg/kg) *per os*.

4. When used in *curative* treatment of mice tuberculosis (treatment started 14 days after infection), great differences are observed between the activities of the two drugs.

a) Doses of 0,1, 0,2 and 0,4 mg/day/mouse of B 663 used *alone* are active. The action of B 663 very much resembles that of INH and 1314 Th : rapid bactericidy and appearance of resistant bacilli after two months treatment. *The association* of the same doses of B 663 with INH or 1314 Th increases the therapeutical effect of these drugs : this association prevents the appearance of resistant bacilli and increases the bactericidal power in such a way that after three months treatment the organs of mice contain only a few cultivable bacilli, which may be considered as « persistent sensitives ».

b) On the contrary, B 720 used *alone* only prolongs a few days the survival time of infected animals ; *in association* with INH it very little improves the activity of INH used alone and slightly delays the appearance of INH-resistant bacilli.

The activity of B 663 is therefore much higher than that of B 720 in mice tuberculosis. On account of the excellent experimental results obtained when low doses are associated with other anti-tuberculous drugs, it would be desirable that B 663 be used in human therapy.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BARRY (V. C.), BELTON (J. G.), CONALTY (M. C.), DENNENY (J. M.), EDWARD (D. W.), O'SULLIVAN (J. F.), TWOMEY (D.) et WINDER (F.). *Nature*, 1957, **179**, 1013.
- [2] BARRY (V. C.) et CONALTY (M. C.). *Amer. Rev. Tub.*, 1958, **78**, 62.
- [3] BARRY (V. C.). *Bull. Un. intern. Tub.*, 1958, **28**, 211.
- [4] BARRY (V. C.), BUGGLE (K.), BYRNE (J.), CONALTY (M. C.) et WINDER (F.). *Bull. Un. intern. Tub.*, 1959, **29**, 582.
- [5] NOUFFLARD (H.) et BERTEAUX (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 449.
- [6] HIRSCH (J.). *Tuberkulosearzt*, 1958, **12**, 196.
- [7] VISCHER (W. A.), TIRANARAYANAN (N. O.) et BRUHIN (M.). *Beitr. klin. Tub.*, 1958, **119**, 59.
- [8] SCHMIDT (L. H.). *Rapport à la XV^e Conf. Un. Intern. Tub.*, Istanbul, 1959.
- [9] GRUMBACH (F.). *Actes du VI^e Congrès intern. Microbiol.*, Rome, 1953, **1**, 553.
- [10] RIST (N.) et GRUMBACH (F.). *Rev. Tub.*, 1951, **15**, 665.
- [11] GRUMBACH (F.), RIST (N.), LIBERMANN (D.) et coll. *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 2187.
- [12] ACHARYA (B. K.), ROBSON (J. M.) et SULLIVAN (F. M.). *Am. Rev. Tub.*, 1959, **80**, 871.
- [13] GRUMBACH (F.) et RIST (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 373.
- [14] MACKANESS (G. B.). *Amer. Rev. Tub.*, 1953, **67**, 322.
- [15] BASILICO (F.), BERLOCO (N.) et GRASSI (C.). *Atti. Soc. Lombarda Sci. med. biol.*, 1959, **14**, 251.
- [16] STEENKEN (W. Jr.), MONTALBINE (V.) et SMITH (M. M.). *Amer. Rev. resp. Dis.*, 1960, **81**, 764.

THERMO-RÉSISTANCE
DES MYCOBACTÉRIES TUBERCULEUSES.
RELATION AVEC LE POUVOIR PATHOGÈNE

SOUCHES HUMAINES, BOVINES, BCG, AVIAIRES, PARATUBERCULEUSES

par M. H. MOUREAU, J. BRETEY et M^{me} D. ROY (*)

(Institut Pasteur, Service de la Tuberculose).

DEUXIÈME PARTIE.

II. — THERMO-RESISTANCE ET POUVOIR PATHOGENE

Nous venons de préciser, par une publication antérieure [1], la thermo-résistance des Mycobactéries.

Nous pouvons vérifier s'il existe un rapport entre cette thermo-résistance et le pouvoir pathogène des germes étudiés. Deux questions peuvent se poser :

1° *La thermo-résistance est-elle proportionnelle au pouvoir pathogène de la souche considérée ?*

2° *Les germes survivants (à des températures légèrement inférieures à la température létale) subissent-ils une modification du pouvoir pathogène et dans quel sens ?*

La réponse à la première question est aisée. Il suffit de considérer à nouveau les résultats des tableaux concernant les dix souches humaines et les dix souches bovines étudiées qui possèdent toutes un pouvoir pathogène tantôt élevé, tantôt faible. On ne décèle aucune corrélation entre le pouvoir pathogène (avant l'expérience) et le degré de thermo-résistance de ces germes. Déjà certains auteurs avaient tenté de lier l'un et l'autre (Larmola [2]), sans y parvenir.

La réponse à la deuxième question sera l'essentiel de la seconde partie de cette étude.

(*) Manuscrit reçu le 13 avril 1960.

Nous pouvions utiliser deux méthodes pour apprécier les modifications du pouvoir pathogène des colonies microbiennes issues de germes ayant survécu à des températures légèrement inférieures aux températures létales.

La première méthode consistait à comparer la virulence de deux suspensions microbiennes : l'une, obtenue à partir de germes n'ayant jamais été chauffés (suspension témoin : 1mg/ml), l'autre (1 mg/ml) obtenue à partir de colonies (de la même souche) issues de germes ayant résisté au chauffage à une température légèrement inférieure à la *température létale*, et cultivés à l'étuve.

La seconde méthode consistait à comparer également la virulence de deux suspensions microbiennes : l'une témoin (1 mg/ml), non chauffée et l'autre identique, mais chauffée et *immédiatement injectée à l'animal, sans culture à l'étuve*.

Nous avons utilisé successivement les deux méthodes.

Grâce à la première méthode, nous avons défini les modifications du pouvoir pathogène en comparant *des suspensions de concentrations égales des mêmes bactéries*, les unes chauffées, les autres non chauffées.

Grâce à la seconde méthode, nous avons pu confirmer directement *in vivo* l'exactitude des résultats obtenus précédemment *in vitro* dans la première partie de ce mémoire. Les rares bacilles survivants aux températures infra-létales étant, comme nous le verrons, capables de tuberculiser le cobaye.

A. — RÉSULTATS DE LA PREMIÈRE MÉTHODE.

Comparaison entre la virulence de deux suspensions microbiennes de la même souche, l'une témoin, non chauffée, l'autre, obtenue à partir de colonies de la même souche mais issues de germes ayant résisté à un chauffage à une température infra-létale, et cultivés à l'étuve.

En matière de contamination tuberculeuse par voie digestive, il avait été admis par certains auteurs que les *Mycobactéries* ayant résisté au chauffage, par exemple lors de la pasteurisation, ont un pouvoir pathogène nettement diminué, sinon détruit. Il nous a paru intéressant de vérifier ces affirmations.

Nous avons, comme dans la première partie, opéré d'abord en suspension dans l'eau, ensuite dans le lait. L'animal d'expérience choisi était le cobaye. Nous avons conservé notre dilution à 1 mg/ml qui peut paraître trop forte, mais au début, nous avions été influencés par les auteurs précédents. Au cours de l'expérimentation concernant la seconde méthode d'étude du pouvoir pathogène, nous pourrions constater que ces doses sont justifiées.

Il s'agit de trois souches *humaines* : Brévannes, 977, 1006, et de trois souches *bovines* : 2002, 2300 et Ivry 2.

TABLEAU I.

SOUCHES HUMAINES	I GERMES TÉMOINS Suspension à 1 mg. par ml. de la souche normale (culture de 3 semaines - 1 mois) Injection sous-cutanée 1 cm ³ par animal 4 cobayes pour chaque série		II SUSPENSION DE GERMES OBTENUS A PARTIR DE COLONIES AYANT RESISTE AU CHAUFFAGE ET S'ETANT DEVELOPPEES NORMALEMENT (1 mg./1 ml.) et injection sous-cutanée	
	Cultivés après chauffage à 80°20 minutes		Cultivés après chauffage à 80°20 minutes	
Brévannes	1 - 56ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°1)		1 - 48ème j. : MORT Lésions nombreuses (c. n°5)	
	2 - 57ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°2)		2 - 50ème j. : Sacrifié Lésions nombreuses (c. n°6)	
	3 - 57ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°3)		3 - 50ème j. : Sacrifié Lésions nombreuses (c. n°7)	
	4 - 57ème j. : Sacrifié Lésions rares (c. n°4)		4 - 50ème j. : Sacrifié Lésions nombreuses (c. n°8)	
977 très pathogène fraichement isolée	1 - 35ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°13)		1 - 35ème j. : MORT Lésions moyennes (c. n°17)	
	2 - 42ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°14)		2 - 48ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°18)	
	3 - 46ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°15)		3 - 48ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°19)	
	4 - Maladie intercurrente (c. n°16)		4 - Maladie intercurrente (c. n°20)	
1006 très pathogène fraichement isolée	1 - 34ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°25)		1 - 40ème j. : Sacrifié Lésions généralisées légèrement augmentées par rapport aux témoins (c. n°29)	
	2 - 40ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°26)		2 - 40ème j. : Sacrifié Lésions généralisées légèrement augmentées par rapport aux témoins (c. n°30)	
	3 - 40ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°27)		3 - 40ème j. : Sacrifié Lésions généralisées légèrement augmentées par rapport aux témoins (c. n°31)	
	4 - Maladie intercurrente (c. n°28)		4 - 40ème j. : Sacrifié Lésions généralisées légèrement augmentées par rapport aux témoins (c. n°32)	
M. DRES ROVINES	Cultivés après chauffage à 85°5 minutes		Cultivés après chauffage à 85°5 minutes	
	1 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°37)		1 - 39ème j. : MORT Lésions légèrement plus marquées que les témoins (c. n°41)	
	2 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°38)		2 - 40ème j. : Sacrifié Lésions identiques (c. n°42)	
	3 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°39)		3 - 40ème j. : Sacrifié Lésions identiques (c. n°43)	
2.002 pathogène souche Collection	4 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°40)		4 - 40ème j. : Sacrifié Lésions identiques (c. n°44)	
	Cultivés après chauffage à 80°20 minutes		Cultivés après chauffage à 80°20 minutes	
	1 - 49ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°44)		1 - 37ème j. : MORT Lésions identiques aux témoins (c. n°53)	
	2 - 49ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°45)		2 - 43ème j. : MORT Lésions identiques aux témoins (c. n°54)	
2.300 pathogène souche Collection	3 - 49ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°46)		3 - 45ème j. : MORT Lésions identiques aux témoins (c. n°55)	
	4 - 49ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°47)		4 - 45ème j. : MORT Lésions identiques aux témoins (c. n°56)	
	Cultivés après chauffage à 80°10 minutes		Cultivés après chauffage à 80°10 minutes	
	1 - 29ème j. : MORT Lésions moyennes (c. n°61)		1 - 29ème j. : MORT Lésions faibles (c. n°65)	
Ivry très pathogène fraichement isolée	2 - 40ème j. : MORT Lésions moyennes (c. n°62)		2 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°66)	
	3 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°63)		3 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°67)	
	4 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°64)		4 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°68)	

Dans le tableau synthétique (tableau I) nous décrivons dans la colonne I les cobayes injectés avec les suspensions témoins et dans la colonne II les cobayes injectés avec les suspensions de germes issus de colonies ayant résisté à des chauffages infralétaux. Selon l'évolution de l'infection et les souches étudiées, ou bien nous avons sacrifié les animaux, ou bien nous avons laissé évoluer la maladie, chacune des deux méthodes nous ayant semblé intéressante selon les cas. Tous les animaux ont un numéro de référence qui permet de retrouver pour chacun d'eux les détails des lésions dans le tableau II.

B. — RÉSULTATS DE LA SECONDE MÉTHODE.

Comparaison entre la virulence de deux suspensions microbiennes de la même souche, l'une *témoin* (non chauffée), l'autre de concentration identique mais *chauffée* (à une température voisine de la température létale, précisée cette fois) et *injectée immédiatement à l'animal* (tableau III).

Nous pouvons, là aussi, comparer les lésions des cobayes témoins (colonne I, mêmes témoins que dans l'expérience précédente) avec celles des cobayes injectés avec une suspension des mêmes germes mais qui venaient d'être chauffés à des températures voisines de la température létale (température précisée chaque fois).

À la lecture des tableaux synthétiques concernant la seconde méthode, nous devons avoir présente à l'esprit la notion que nous ne comparons pas en réalité le pouvoir pathogène de concentrations identiques de germes vivants, mais d'une part de germes vivants (les témoins, 1 mg) et d'autre part, de quelques rares germes qui viennent de résister au chauffage et qui sont immédiatement injectés à l'animal.

Nous pouvons reprendre en les comparant souche par souche les résultats de nos expériences *in vitro* exposés dans les tableaux de la première partie de notre étude.

La souche humaine Brévannes : les quatre cobayes ont présenté une infection de gravité moyenne à la suite d'une injection de suspensions à 1 mg/ml, chauffée à 75° trente minutes. La thermo-résistance mesurée *in vitro*, dans l'eau, était seulement de 70° trente minutes et dans le lait de 80° vingt minutes. Nous avons déjà signalé les variations de la souche Brévannes.

La souche humaine 977 : la concordance des résultats *in vivo* et *in vitro* est assez remarquable. Cette souche chauffée à 85° quinze minutes tuberculise et amène la mort de 3 cobayes sur 4, avec de très graves lésions, alors que *in vitro*, elle résistait à 85° dix minutes.

TABLEAU II. — Germes en suspension dans l'eau.

COBAYE	GANGLIONS			FOIE	RATE	POUMONS
	INGUINAUX	SOUS-LOMBAIRES	TRACHÉO-BRONCHIQUES			
1	légère hypertrophie	petit pois	légère hypertrophie	env. 30 tubercules granulations généralisées	env. 25 tubercules $V \times 2$	quelques tubercules nombreux tubercules
2	légère hypertrophie	petit pois	légère hypertrophie	sems de fines granulations	$V \times 2$ nombreux tubercules	env. 12 tubercules
3	légère hypertrophie	gros pois	légère hypertrophie	nombreux tubercules	O	O
4	légère hypertrophie	gros grain blé	légère hypertrophie	quelques tubercules	nombreux tubercules	assez nombreux tub.
5	légère hypertrophie	grain blé	hypertrophie	rares tubercules	quelques tubercules	quelques tubercules
6	légère hypertrophie	grain blé	légère hypertrophie	rares tubercules	environ 10 gros tub.	O
7	légère hypertrophie	petit pois	hypertrophie	rares granulations	assez nombreuses granulations	très rares lésions
8	légère hypertrophie	petit pois	extrême hypertrophie	très fins tubercules	rares tubercules	très rares tubercules
9	hypertrophie	légère hypertrophie	légère hypertrophie	nombreux tubercules	rares tubercules	très rares tubercules
10	hypertrophie	légère hypertrophie	légère hypertrophie	nombreux tubercules	rares tubercules	très rares tubercules
11	hypertrophie	légère hypertrophie	légère hypertrophie	nombreux tubercules	rares tubercules	très rares tubercules
12	hypertrophie	légère hypertrophie	légère hypertrophie	lésions confluentes	lésions confluentes	lésions confluentes
13	hypertrophie	pois	hypertrophie	lésions confluentes	lésions confluentes	lésions confluentes
14	hypertrophie	pois	hypertrophie	lésions confluentes	lésions confluentes	quelques tubercules
15	hypertrophie	pois	hypertrophie	lésions confluentes	lésions confluentes	quelques tubercules
16	<i>maladie intercurrente</i>					
17	hypertrophie	hypertrophie	hypertrophie	lésions confluentes	lésions presque conf.	très nombreux tub.
18	hypertrophie	O	hypertrophie	lésions confluentes	$V \times 4$ très nombreux tub.	très nombreux tub.
19	hypertrophie	gros haricot	$V \times 3$	lésions presque conf.	$V \times 4$ lésions confluentes	très nombreux tub.
20	<i>maladie intercurrente</i>					
21 (*)						
22	hypertrophie	hypertrophie	très hyper.	lésions confluentes	$V \times 3$	nombreux tubercules
23	hypertrophie	petit pois	très hyper.	nombreux tubercules	$V \times 3$ nombreux tubercules	caséifiés
24	<i>aucune lésion</i>	petit pois	petit pois	assez nombreux tub.	nombreux tubercules	5 à 6 tubercules
25	petit pois	hypertrophie	hypertrophie	lésions confluentes	$V \times 3$ très nombreux tub.	assez nombreux tub.
26	très hyper.					

TABLEAU II (suite).

COBAYE	GANGLIONS			FOIE	RATE	POUMONS
	INGUINAUX	SOUS-LOMBAIRES	TRACHÉO-BRONCHIQUES			
51	hypertrophie	gros grain blé	légère hypertrophie	lésions confluentes	V x 12 lésions confluentes	O
52	hypertrophie	gros grain blé	légère hypertrophie	lésions confluentes	V x 4	O
53	hypertrophie	petit pois	légère hypertrophie	lésions confluentes	V x 7 lésions confluentes	nombreux tubercules
54	hypertrophie	petit pois	légère hypertrophie	lésions confluentes	V x 5 rares tubercules	nombreux tubercules
55	hypertrophie	petit pois	légère hypertrophie	nombreux tubercules	V x 8	nombreux fins tub.
56	hypertrophie	petit pois	légère hypertrophie	nombreux tubercules	V x 7	nombreux fins tub.
57	hypertrophie	petit pois	légère hypertrophie	nombreux tubercules	V x 10 hémorragique	nombreux tubercules
58	aucune lésion					
59	aucune lésion					
60	maladie intercurrente					
61	légère hypertrophie	légère hypertrophie	légère hypertrophie	nombreux fins tub.	V x 2 nécrolique	O
62	légère hypertrophie	légère hypertrophie	légère hypertrophie	caséifiés	V x 15 rares tubercules	quelques tubercules
63	hypertrophie	hypertrophie	hypertrophie	nombreux tubercules	V x 5	nombreux tubercules
64	hypertrophie	hypertrophie	hypertrophie	nombreuses fines granulations	V x 3	O
65	hypertrophie	hypertrophie	hypertrophie	quelques tubercules		
66	légère hypertrophie	haricot	légère hypertrophie	assez nombreux tub.	quelques tubercules	O
67	légère hypertrophie	haricot	légère hypertrophie	nombreux tubercules	rares granulations	rares tubercules
68	légère hypertrophie	haricot	légère hypertrophie	nombreux tubercules	quelques tubercules	rares tubercules
69	aucune lésion		légère hypertrophie	assez nombreux tub.	quelques tubercules	quelques fins tub.
70	aucune lésion					
71	aucune lésion					
72	maladie intercurrente					

TABLEAU III.

	GERMES TEMOINS		GERMES CHAUFFES EXTROPORANEMENT, REFOIDIS ET INJECTES AUSSITOT	
	Suspension à 1 mg. par ml. de la souche normale (culture de 3 semaines - 1 mois) Injection sous-cutanée 1 cm ³ par animal 4 cobayes pour chaque série		(mêmes doses et même mode opératoire)	
<u>SOUCHES HUMAINES</u>				
<u>Brévannes</u>	1 - 56ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°1)	Chauffage extemporané à 80°20 minutes 1 - 48ème j. : MORT Lésions moyennes	(c. n°9)
	2 - 57ème j. : Sacrifié Lésions généralisées	(c. n°2)	2 - 49ème j. : MORT Lésions moyennes	(c. n°10)
	3 - 57ème j. : Sacrifié Lésions généralisées	(c. n°3)	3 - 64ème j. : Sacrifié Lésions rares	(c. n°11)
	4 - 57ème j. : Sacrifié Lésions rares	(c. n°4)	4 - 64ème j. : Sacrifié Lésions rares	(c. n°12)
277 très pathogène fraîchement isolée	1 - 35ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°13)	Chauffage extemporané à 85°15 minutes 1 - 55ème j. : Intradermo +++ 82ème j. : MORT Lésions confluentes	(c. n°21)
	2 - 42ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°14)	2 - 55ème j. : Intradermo 14mm. de diamètre 94ème j. : MORT Lésions confluentes	(c. n°22)
	3 - 46ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°15)	3 - 55ème j. : Intradermo ++ 11ème j. : MORT Lésions confluentes	(c. n°23)
	4 - Maladie intercurrente	(c. n°16)	4 - 55ème j. : Intradermo négative 214ème j. : Sacrifié Aucune lésion	(c. n°24)
1006 très pathogène fraîchement isolée	1 - 34ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°25)	Chauffage extemporané à 80°20 minutes 1 - 27ème j. : Intradermo +++ 116ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°33)
	2 - 40ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°26)	2 - 27ème j. : Intradermo +++ 161ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°34)
	3 - 40ème j. : Sacrifié Lésions généralisées	(c. n°27)	3 - 27ème j. : Intradermo +++ 163ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°35)
	4 - Maladie intercurrente	(c. n°28)	4 - 27ème j. : Intradermo +++ 169ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°36)
<u>SOUCHES BOVINES</u>				
2.002 pathogène Souche Collection	1 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes	(c. n°37)	Chauffage extemporané à 80°20 minutes 1 - 27ème j. : Intradermo + 188ème j. : MORT Lésions confluentes	(c. n°45)
	2 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes	(c. n°38)	2 - 27ème j. : Intradermo négative 201ème j. : Intradermo négative 204ème j. : Sacrifié Aucune lésion	(c. n°46)
	3 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes	(c. n°39)	3 - 27ème j. : Intradermo négative 201ème j. : Intradermo négative 204ème j. : Sacrifié Aucune lésion	(c. n°47)
	4 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes	(c. n°40)	4 - 27ème j. : Intradermo négative 201ème j. : Intradermo négative 204ème j. : Sacrifié Aucune lésion	(c. n°48)
2.300 pathogène Souche Collection	1 - 49ème j. : MORT Lésions généralisées	(c. n°49)	Chauffage extemporané à 80°20 minutes 1 - 57ème j. : Intradermo ++ 199ème j. : MORT Lésions identiques aux témoins (c. n°57)	
	2 - 49ème j. : Sacrifié Lésions généralisées	(c. n°50)	2 - 57ème j. : Intradermo négative 230ème j. : Intradermo négative 232ème j. : Sacrifié Aucune lésion	(c. n°58)
	3 - 49ème j. : Sacrifié Lésions généralisées	(c. n°51)	3 - 57ème j. : Intradermo négative 230ème j. : Intradermo négative 232ème j. : Sacrifié Aucune lésion	(c. n°59)
	4 - 49ème j. : Sacrifié Lésions généralisées	(c. n°52)	4 - Maladie intercurrente	(c. n°60)
Ivry très pathogène fraîchement isolée	1 - 29ème j. : MORT Lésions moyennes	(c. n°61)	Chauffage extemporané à 80°20 minutes 1 - 27ème j. : Intradermo négative 201ème j. : Intradermo négative 204ème j. : Sacrifié Aucune lésion	(c. n°69)
	2 - 40ème j. : MORT Lésions moyennes	(c. n°62)	2 - 27ème j. : Intradermo négative 201ème j. : Intradermo négative 204ème j. : Sacrifié Aucune lésion	(c. n°70)
	3 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes	(c. n°63)	3 - 27ème j. : Intradermo négative 201ème j. : Intradermo négative 204ème j. : Sacrifié Aucune lésion	(c. n°71)
	4 - 40ème j. : Sacrifié Lésions moyennes	(c. n°64)	4 - Maladie intercurrente	(c. n°72)

La souche humaine 1006, une des plus pathogènes que nous avons étudiée, restait assez virulente après un chauffage de 80° vingt minutes pour tuberculiser les cobayes et les amener à la mort, l'un en cent seize jours, et les trois autres en cent soixante et un, cent soixante-trois, cent soixante-neuf jours. *In vitro* on a observé quelques colonies à 85° cinq minutes, davantage à 80° dix minutes et aucune à 80° vingt minutes.

La souche bovine 2002 : après chauffage à 80° vingt minutes un seul cobaye est mort au cent quatre-vingt-huitième jour ; les trois autres n'ont absolument pas été contaminés (intradermo-réactions négatives au vingt-septième et au deux cent unième jour). *In vitro* la résistance ne se manifestait que jusqu'à 80° dix minutes, 85° cinq minutes, mais non à 80° vingt minutes.

La souche bovine 2300 après chauffage de la suspension microbienne à 80° vingt minutes, a provoqué une intradermo-réaction positive chez un seul animal qui est mort au cent quatre-vingt-quinzième jour, les autres animaux n'étant pas contaminés. *In vitro*, nous avons relevé une résistance modérée à 80° cinq minutes et la présence d'une seule colonie à 80° vingt minutes.

La souche bovine Ivry 2, après chauffage de la suspension à 80° vingt minutes, s'est montrée totalement inoffensive pour tous les animaux. *In vitro* nous avons constaté une thermo-résistance de 80° cinq minutes et pas au-delà.

La persistance du pouvoir pathogène des germes chauffés en solution dans l'eau pouvait être remise en cause dans le cas des germes pathogènes mis en suspension dans le lait.

Nous avons donc repris l'expérience avec les suspensions des germes dans le lait pour *quatre souches seulement* : une souche humaine (Brévannes) et trois souches bovines (1099, Dupray S, Ivry 2).

Nous avons préparé une suspension dans le lait et nous l'avons injectée aux animaux après l'avoir chauffée aux températures voisines de celles que nous savions être critiques grâce aux résultats de nos expériences précédentes, *in vitro*, dans l'eau et le lait.

La voie d'injection de cette suspension dans le lait était la voie sous-cutanée. On pouvait craindre ainsi des modifications cliniques dans l'évolution des tuberculoses provoquées. Nous avons simplement relevé qu'elles étaient plus graves, plus complètes, mais malgré cela, d'évolution plus lente que lorsque les germes sont dans une suspension dans l'eau. Comme précédemment, nous indiquons d'abord dans un tableau synthétique, puis dans le tableau V, les détails des lésions des animaux.

La souche humaine Brévannes, toujours irrégulière, après chauffage à 75° vingt minutes, n'a provoqué une infection tuberculeuse que sur un seul animal sur quatre.

TABLEAU IV.

	TEMOINS (dans le lait) Suspension à 1 mg. par ml. de la souche normale (culture de 3 semaines - 1 mois) Injection sous-cutanée 1 cm ³ par animal 4 cobayes pour chaque série	GERMES CHAUFFÉS EXTÉMPIRANÉMENT DANS LE LAIT ET INJECTÉS AUSSITÔT (mêmes doses et même mode opératoire)
<u>SOUCHES HUMAINES</u>		
<u>Brévanes</u>	1 - 49ème j. : Intradermo +++ (nécrose) 112ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°1) 2 - 49ème j. : Intradermo +++ (nécrose) 174ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°2) 3 - 49ème j. : Intradermo +++ (nécrose) 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées confluentes (c. n°3) 4 - 49ème j. : Intradermo +++ (nécrose) 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées confluentes (c. n°4)	Chauffage extemporané à 75°20 minutes 1 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 179ème j. : Sacrifié Lésions rares (c. n°5) 2 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 179ème j. : Sacrifié Aucune lésion (c. n°6) 3 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 179ème j. : Sacrifié Aucune lésion (c. n°7) 4 - Maladie intercurrente (c. n°8)
<u>SOUCHES BOVINES</u>		
<u>1099</u>	1 - 49ème j. : Intradermo +++ (nécrose) 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°9) 2 - 49ème j. : Intradermo +++ (nécrose) 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°10) 3 - 49ème j. : Intradermo +++ (nécrose) 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°11) 4 - Maladie intercurrente (c. n°12)	Chauffage extemporané à 75°20 minutes 1 - 49ème j. : Intradermo +++ (nécrose) 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°13) 2 - 49ème j. : Intradermo ++ 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°14) 3 - 49ème j. : Intradermo + 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°15) 4 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 179ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°16)
<u>Dupray S</u>	1 - 49ème j. : Intradermo ++ 70ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°17) 2 - 49ème j. : Intradermo ++ 79ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°18) 3 - 49ème j. : Intradermo ++ 96ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°19) 4 - Maladie intercurrente (c. n°20)	Chauffage extemporané à 75°20 minutes 1 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 171ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°21) 2 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°22) 3 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°23) 4 - 49ème j. : Intradermo + (très faibl ^t) 179ème j. : Sacrifié Aucune lésion (c. n°24)
<u>Ivry</u>	1 - 49ème j. : Intradermo +++ 70ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°25) 2 - 49ème j. : Intradermo +++ 83ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°26) 3 - 49ème j. : Intradermo +++ 110ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°27) 4 - 49ème j. : Intradermo +++ 112ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°28)	Chauffage extemporané à 75°20 minutes 1 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 126ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°29) 2 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 174ème j. : MORT Lésions généralisées (c. n°30) 3 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 179ème j. : Sacrifié Lésions généralisées (c. n°31) 4 - 49ème j. : Intradermo + (faiblement) 179ème j. : Sacrifié Lésions moyennes (c. n°32)

La souche bovine 1099, après chauffage à 75° vingt minutes a tuberculisé les 4 cobayes. *In vitro*, elle manifestait une résistance à 70° trente minutes mais non à 80° dix minutes.

TABLEAU V. — Germes en suspension dans le lait.

COBAYE	GANGLIONS			FOIE	RATE	POUMONS
	INGUINAUX	SOUS-LOMBAIRES	TRACHÉO-BRONCHIQUES			
1	très hyper.	pois	très hyper.	lésions confluentes	V x 4 gros tub.	très nombreux tub.
2	légère hypertrophie	légère hypertrophie	hypertrophie	lésions confluentes	nombreuses granul.	caséifiés
3	très hyper.	pois	extrême hyper.	nombreux gros tub.	nombreux gros tub.	complet, caséifiés
4	légère hypertrophie	légère hypertrophie	légère hypertrophie	fin granulations	1 très gros tubercule	complet, caséifiés
5	légère hypertrophie	légère hypertrophie	hypertrophie	O	O	rare tubercules
6	aucune lésion					
7	maladie intercurrente					
8	hypertrophie	hypertrophie	hypertrophie	lésions confluentes	V x 6 lésions confl.	assez nomb. gros tub.
9	extrême hyper.	petit pois	hypertrophie	lésions confluentes	V x 3	assez nombreux tub.
10		petit pois	hypertrophie	lésions confluentes	V x 8	complètement caséifiés
11	petit pois					
12	maladie intercurrente	petit pois	hypertrophie	assez nombreux tub.	V x 8	caséifiés
13						
14	petit pois	petit pois	hypertrophie	lésions confluentes	V x 2	caséifiés
15	petit pois	petit pois	hypertrophie	quelques tubercules	V x 2	assez nombreux gros tubercules
16	légère hypertrophie	légère hypertrophie	légère hypertrophie	O	10 gros tubercules	O
17	légère hypertrophie	petit pois	légère hypertrophie	fin granulations	rare tubercules	très nombreux tub.
18	légère hypertrophie	petit pois	légère hypertrophie	fin granulations	V x 6 nomb. tub.	quelques tubercules
19	hypertrophie	hypertrophie	très hyper.	nombreux tubercules	V x 4	très nombreux tub.
20	maladie intercurrente				V x 3	
21	petit pois	pois	hypertrophie	quelques tubercules	V x 2 nomb. tub.	nombreux tubercules
22	hypertrophie	petit pois	O	O	quelques tubercules	très nombreux tub.
23	hypertrophie	petit pois		fin granulations	lésions confluentes	nombreux tubercules
24	aucune lésion					
25	hypertrophie	pois	hypertrophie	lésions confluentes	V x 8 lésions confl.	très nombreux tub.
26	hypertrophie	petit pois	hypertrophie	très nombreux tub.	V x 2	très nombreux tub.
27	hypertrophie	petit pois	hypertrophie	V x 2	V x 8 fines granul.	nombreux tubercules
28	hypertrophie	légère hypertrophie	hypertrophie	V x 3	V x 6 fines granul.	nombreux tubercules
29	hypertrophie	légère hypertrophie	hypertrophie	V x 6 nomb. granul.	V x 2	caséifiés
30	hypertrophie	petit pois	hypertrophie	V x 2	V x 2	complètement caséifiés
31	extrême hyper.	extrême hyper.	extrême hyper.	lésions confluentes	lésions confluentes	caséifiés
32	petit pois	petit pois	légère hypertrophie	lésions confluentes	V x 3	caséifiés
				O	nombreux gros tub.	quelques tubercules
					fin granulations	

La souche Dupray S après chauffage à 75° vingt minutes a tuberculisé 3 cobayes sur 4. Elle résistait *in vitro* à 70° trente minutes (très rares colonies).

Enfin la souche Ivry 2 après le même chauffage (75° vingt minutes) a cependant provoqué une tuberculose généralisée chez les 4 animaux injectés. Sa thermo-résistance *in vitro* était de cinq minutes à 80°.

CONCLUSIONS.

Nous pouvons conclure de cette étude que la stérilisation de suspensions de Mycobactéries (humaines, bovines, aviaires) doit s'effectuer à 95° pendant quelques minutes, cinq minutes nous semblant être le minimum nécessaire. Il s'agit de suspensions dans l'eau ou dans le lait.

Pour les mêmes espèces microbiennes en suspension dans des produits pathologiques (débris d'organes, pus, etc.) nous ne pouvons encore donner de chiffres, des recherches ultérieures devant être effectuées.

Dans l'Introduction du présent travail nous avons souhaité ne pas être victimes d'erreurs d'interprétation. La première serait de confondre les deux termes : stérilisation et pasteurisation.

Les derniers mots de notre étude apporteront une note un peu moins austère et en même temps un témoignage en faveur de la remarquable continuité des espèces microbiennes.

Lorsque toute la partie expérimentale de cette étude fut terminée, nous avons rencontré dans la bibliographie les chiffres suivants, obtenus par inoculation de liquides d'origine tuberculeuse dans le péritoine des cobayes après chauffage. Les bacilles étaient tués à :

55° au bout de	4 heures
60° au bout de	1 heure
70° au bout de	10 minutes
80° au bout de	5 minutes
90° au bout de	2 minutes
95° au bout de	1 minute

Les auteurs concluaient : « On voit donc que si l'on veut que la pasteurisation du lait détruise sûrement les bacilles tuberculeux que celui-ci peut contenir, il faut porter le liquide à 70° au moins pendant dix minutes. »

Ces travaux de Man [3] sous l'inspiration de Forster datent de 1893 !

Quelques années plus tard nous pensons pouvoir les confirmer.

RÉSUMÉ

La recherche du degré exact de la thermo-résistance des Mycobactéries tuberculeuses en suspension dans l'eau et dans le lait (1 mg par millilitre) a donné les résultats suivants : pour les dix souches humaines étudiées 10 résistaient à 70° quinze minutes, 3 à 80° et 2 à 85°. Les résultats dans l'eau et dans le lait étaient comparables. Pour les souches bovines dix sur dix résistaient à 70° dix minutes, 4 à 80° cinq minutes et 3 à 85° cinq minutes. Aucune résistance n'était relevée à 90°.

Avec les souches aviaires on a des résultats comparables, mais avec les paratuberculeux la thermo-résistance est encore plus élevée et atteint fréquemment 90°. Il s'agit dans ces cas de thermo-résistance de quelques rares colonies isolées et résistantes ; avec des dilutions plus faibles leur nombre diminue proportionnellement. Nous pensons que les anciens auteurs qui citaient des thermo-résistances de Mycobactéries de type humain ou bovin à 90° expérimentaient en réalité avec des paratuberculeux. Tous les détails de la technique sont décrits dans l'article.

Dans la deuxième partie nous avons recherché si la thermo-résistance agissait en sélectionnant des bactéries plus pathogènes ou si au contraire elle était liée à l'existence préalable de colonies plus résistantes. Nous n'avons découvert aucune action dans aucun sens de la chaleur sur le pouvoir pathogène.

SUMMARY

THERMO-RESISTANCE OF *Mycobacterium tuberculosis*.

RELATIONSHIP WITH PATHOGENICITY

(HUMAN, BOVINE, AVIAN, BCG AND *paratuberculosis* STRAINS).

Experiments on the thermo-resistance of *M. tuberculosis* suspended in water and in milk (1 mg/ml) yielded the following results.

The 10 human strains studied resisted to 70° during 15 minutes, 3 strains to 80° and 2 strains to 85°. The findings in water and in milk were similar.

The 10 bovine strains studied resisted 10 minutes to 70°, 4 strains to 80° during 5 minutes, and 3 strains to 85° during 5 minutes. No resistance was observed at 90°.

The avian strains yielded similar results, but the resistance of *M. paratuberculosis* strains was higher, often reaching 90° ; but only a few colonies showed such a high thermoresistance ; with

the dilution of the suspension, their number considerably decreased. It is probable that other authors who reported the existence of human or bovine *M. tuberculosis* strains resistant to 90° actually worked with *M. paratuberculosis*.

All the details of the technique are described in the paper.

In the second part, the authors describe their efforts to find out whether thermoresistance acted by selecting pathogenic bacilli, or if it was due to preexisting heat-resistant colonies. They did not succeed in stating any influence of heat on the pathogenicity of bacilli.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MOUREAU (M. H.) et coll. *Ann. Inst. Pasteur*, 1960.
 - [2] LARMOLA (E.). *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 1943, **151**, 48.
 - [3] DE MAN. *Arch. Hyg.*, 1893, **13**, 133.
-

L'IDENTIFICATION DES MYCOBACTÉRIES PAR LA RECHERCHE DE L'ACIDE NICOTINIQUE

par H. BOISVERT (*).

(*Institut Pasteur, Service de la Tuberculose* [D^r J. BRETEY])

Au cours de ces dernières années, l'apparition de souches de bacilles tuberculeux profondément modifiées par l'action des antibiotiques et la mise en évidence dans des lésions humaines de « Mycobactéries pulmonaires pathogènes autres que le bacille tuberculeux » (ex-atypiques) ont singulièrement compliqué le problème de l'identification des diverses espèces de Mycobactéries.

Cependant, de nouvelles méthodes ont été proposées dont certaines, faciles à mettre en œuvre dans tous les laboratoires, apportent un élément, parfois décisif, pour la détermination du type bacillaire.

Pope et Smith [22] ont montré, en 1946, que le bacille tuberculeux humain produit davantage d'acide nicotinique que le bacille bovin.

Konno, depuis 1953 [13 à 18], a particulièrement étudié cette question. Il recherchait tout d'abord la niacine dans le liquide de Sauton ensemencé en voile, puis sur les colonies détachées d'un milieu à l'œuf, suivant la technique de Koenig (Feinstein, 1945 [7]) : 20-40 mg de bacilles sont dissociés dans un petit tube ; on ajoute 0,5 cm³ d'aniline à 4 p. 100 dans l'alcool à 93-100°, puis au bout de cinq à quinze minutes, 0,5 cm³ d'une solution saturée à 10 p. 100 de bromure de cyanogène. Avec le nicotinamide, le BrCN donne un composé pyridinique qui réagit sur les amines en donnant naissance à des composés de couleur jaune. Cependant, les colonies sur milieu solide ne donnent que 0,15 µg d'acide nicotinique par milligramme, poids humide. L'auteur conseille de pratiquer l'épreuve directement sur une culture en Dubos âgée de 10 jours au moins et titrant environ 1 mg de germes au centimètre cube. A 3 cm³ de culture on ajoute 1 cm³ d'aniline et 1 cm³ de BrCN. Tout d'abord l'acide nicotinique est concentré dans les bacilles, puis il diffuse dans le liquide. Au trentième jour,

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 mai 1960.

trois souches humaines donnent en moyenne $12 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $10 \mu\text{g}/\text{mg}$. La souche bovine de collection Ravenel, $2,7 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $2,4 \mu\text{g}/\text{mg}$. Une souche aviaire et 4 paratuberculeux, en général $0,6 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $0,5 \mu\text{g}/\text{mg}$, *M. phlei* $1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $0,8 \mu\text{g}/\text{mg}$.

Ces résultats ont été confirmés par différents auteurs. Marek [19], effectuant le test d'après Jensen sur la culture en milieu à l'œuf sans vert de malachite, constate que sur 517 souches, seul le bacille tuberculeux humain, sensible ou résistant à l'INH ou avirulent, se colore en jaune. Le BCG peut exceptionnellement donner une réaction positive. Jensen et Kiaer [10, 11], sur 242 souches humaines en trouvent 4 négatives, très INH-résistantes, catalase négatives. Dix souches bovines, 33 aviaires et paratuberculeux sont négatives. Gilani et Selkon [8] sur gélose de Dubos dénombrent 13 souches humaines positives, 5 bovines dont 1 BCG, 8 aviaires et paratuberculeux négatifs. Runyon, Merle et Harris [23, 24] exécutent l'épreuve sur le lavage de la culture en milieu solide. Sur 170 souches de bacille humain, ils en observent 2 douteuses, 2 négatives. Sur 3 de bacilles bovins, 2 douteuses, 1 négative. Un bacille de Wells, 1 *M. ulcerans*, 1 *M. microti*, sont positifs, 12 souches de bacilles paratuberculeux et « atypiques » sont négatives.

Koch et Kroll [12], sur 20 souches humaines décèlent 6 négatives; sur 46 souches de bacilles « atypiques », type Battey, 5 positives.

Boenicke [2, 4] préconise avec les cultures en milieu liquide type Youmans, la réaction de Pecknize [21]. A 5 cm^3 de culture âgée de 3 à 5 semaines, chauffée deux heures à 100° , on ajoute 1 cm^3 de chloramine T à 5 p. 100 : coloration jaune en trois-cinq minutes en présence d'acide nicotinique. Si le liquide de culture est jaune, à la suite de la réaction de Pecknize, on pratique celle d'Asmus-Garschagen. Après trois à cinq minutes de repos, on ajoute 3 cm^3 d'acide barbiturique à 1 p. 100 ; agiter et attendre trente minutes : coloration rouge. Seules les souches de *M. t. hominis* donnent de l'acide nicotinique en quantités suffisantes pour être décelées. Néanmoins, quelques vieilles cultures très abondantes de bacilles bovins eugoniques ou de BCG donnent une réaction de Koenig positive et une réaction de Pecknize ou d'Asmus-Garschagen négative.

Grabendorfer-Quincke [9] utilisant ces dernières méthodes, constate une très bonne identification de 737 souches humaines.

Cependant, ces réactions sont moins sensibles que celle de Koenig (Runyon) et conviennent aux cultures en milieu liquide (Konno).

Tacquet, Tison et Macquet [26] ont fait une étude en parallèle avec la sensibilité à l'hydrazide de l'acide thiophène-2-carboxylique (TCH). Le titrage quantitatif sur filtrat de culture en Sauton avec

une solution ammoniacale tamponnée et BrCN révèle des taux variant de 31 à plus de 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ pour 4 souches de type humain, de moins de 1 μg à 4,5 μg pour 9 souches bovines, de moins de 0,5 à 1 pour le BCG.

Les 7 souches aviaires s'échelonnent entre moins de 0,5 et 9,5. Dix Mycobactéries photo, scoto, non photochromogènes donnent des titres de moins de 0,5 à 1,5. Enfin, 2 *Nocardia* d'espèce non spécifiée présentent des taux de 2 et 7 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Le titrage qualitatif est effectué suivant le procédé de Runyon [24] complété par celui de Boenicke [4].

Sur 252 souches humaines, 3 sont négatives.

Les 23 souches bovines et BCG, et les 20 Mycobactéries dites atypiques donnent un test négatif.

Medveczky [20 bis] remplace la solution d'aniline par une solution alcoolique à 3 p. 100 de benzidine. La réaction ne nécessite alors qu'une très petite quantité de culture : 1 mg. La présence d'acide nicotinique se révèle par une coloration rose.

TECHNIQUE.

Nous utilisons la méthode de Koenig suivant différentes modalités. Le BrCN s'altère à la température du laboratoire même en tubes scellés sous un vide relatif ; par contre, la solution à 10 p. 100 se conserve trois à six mois en glacière. Il en est de même de la solution d'aniline à 4 p. 100 dans l'alcool à 96°.

A PARTIR DE COLONIES DÉTACHÉES. — Dans un tube à hémolyse, contenant 0,05 cm^3 d'aniline 4 p. 100, on introduit 20 mg de culture sur milieu à l'œuf, on complète ensuite à 0,5 cm^3 . Après cinq à quinze minutes on ajoute 0,5 cm^3 de BrCN. La lecture se fait rapidement, les colonies de bacille humain deviennent jaune pâle, la couleur passant ensuite dans le liquide.

Cette technique est peu sensible ; une réaction négative doit être vérifiée par les autres méthodes.

SUR CULTURE EN MILIEU SOLIDE. — Nous avons surtout utilisé les cultures sur milieu de Jensen. Pour effectuer l'épreuve dans de bonnes conditions il est nécessaire :

1° D'avoir une culture assez abondante, telle par exemple que celle résultant d'un ensemencement à 10^{-5} mg ou d'un ensemencement en trois points. Avec les souches bovines dysgoniques il faut utiliser une culture sur milieux de Laporte, de Loewenstein ou de Jensen contenant 0,3 p. 100 de pyruvate de sodium (Stonehrink [25], observations personnelles inédites), le meilleur étant celui de Coletso [5] qui permet d'obtenir une bonne culture non seulement avec le bacille bovin, mais aussi avec les souches humaines influencées par les antibiotiques.

2° Plus la culture est âgée, plus elle contient d'acide nicotinique ; on s'adressera à des cultures arrivées à maturité : un mois pour le bacille humain normal.

On introduit à la pipette dans les tubes couchés 0,5 ou 1 cm³ d'ani-line, on imprègne bien la culture. Après cinq à quinze minutes on ajoute avec une seringue munie d'une longue aiguille 0,5 ou 1 cm³ de BrCN. On fait la lecture immédiatement, car après dix minutes la teinte jaune s'atténue. On note la coloration des colonies qui se détachent bien sur le fond vert foncé et celle du liquide.

Le pigment des cultures chromogènes ne diffuse pas.

Pour une réaction nettement positive les colonies seront jaune d'or, le liquide jaune nuancé de vert. Lorsque la réaction est négative les colonies ne se colorent pas et le liquide reste vert malachite. Il existe tous les degrés entre ces deux aspects. Parfois on n'observera, dans les réactions très faibles, qu'une légère nuance jaune dans le liquide.

Les cultures sur gélose de Dubos et de Kirchner conviennent très bien, mais non la gélose à base de bouillon nutritif. On peut aussi utiliser les cultures sur milieu à l'œuf imprégné de tournesol, mais l'observation est un peu moins aisée.

CULTURES EN MILIEUX LIQUIDES. — Dans des tubes contenant 5 cm³ du milieu de Dubos ou de Youmans, on introduit 1 cm³ de chacun des réactifs. La richesse de la culture doit être de l'ordre de 1 mg/cm³, le test peut être pratiqué au dixième ou douzième jour pour les souches humaines. Une réaction très positive donne au milieu une belle teinte jaune d'or. Il est nécessaire d'avoir un tube témoin pour apprécier les réactions faibles.

Les milieux liquides donnent donc une réaction précoce et sensible et cette sensibilité peut être sans doute encore augmentée par l'addition de 1 µg/cm³ d'éthionine (Curatora et Marchesini [6]).

Cependant, une trop grande sensibilité offre des inconvénients : nous avons observé des virages assez nets avec des bacilles chromogènes et même une *Nocardia* en culture de 44 jours, alors que sur milieux solides ces souches demeureraient négatives après plusieurs mois d'étuve.

On voit que la recherche de l'acide nicotinique peut s'effectuer avec les milieux de culture les plus variés, ce qui permet, sans ensemencement spécial, de la vérifier plusieurs fois pour une même souche, pratique nécessaire si l'on obtient tout d'abord une réaction négative ou douteuse.

On pratiquera la réaction sous hotte ou devant une fenêtre ouverte.

Après lecture, éliminer le BrCN en versant dans les tubes quelques centimètres cubes d'ammoniaque.

RÉSULTATS.

Nous avons testé à plusieurs reprises les souches étudiées ; les résultats sont parfois discordants pour une même souche, ce qui indique bien la nécessité de pratiquer plusieurs épreuves. Les souches considérées comme négatives sont celles qui le sont toujours demeurées. Les souches notées comme douteuses ont donné des réactions tantôt négatives, tantôt faiblement ou moyennement positives. Certaines souches positives ont pu présenter un test douteux ou même négatif sur des cultures trop jeunes ou trop pauvres.

M. tuberculosis hominis : 168 souches, la plupart récemment isolées, 106 sensibles aux antibiotiques, 62 mono- ou poly-résistantes : 5 sont notées comme douteuses, dont 4 fortement résistantes à l'INH, une seule est demeurée constamment négative, c'est une souche H37Rv que nous entretenons depuis 1947 sur milieu de Dubos au Twen 80. Cette souche, H37RvD, présente en Dubos un pourcentage de dispersion bacillaire plus élevé que la souche entretenue par passages sur cobaye, elle est à peu près avirulente pour le cobaye et pour la souris (F. Grumbach).

M. tuberculosis bovis : 26 souches. Treize récemment isolées dysgoniques lisses, 6 plus anciennes ou en phase intermédiaire, 7 de collection, eugoniques rugueuses.

Les 2 souches de collection Dupray S et Ravenel sont nettement positives, Ravenel un peu moins que Dupray S qui se comporte comme un bacille humain. Deux souches lisses récentes, cultivées sur milieu au pyruvate peuvent être considérées comme douteuses.

BCG : 12 souches, dont 5 isolées de l'homme. La souche Moscou a présenté sur une culture en Jensen de quatre mois et en Dubos une réaction nettement positive.

M. tuberculosis muris : 3 souches constamment et fortement positives.

M. tuberculosis avium : 16 souches négatives.

M. johnei : 2 souches négatives.

M. ulcerans : 1 souche douteuse.

M. balnei : 1 souche négative.

M. fortuitum : 2 souches négatives.

B. paratuberculeux : 74 souches dont 3 photochromogènes sont négatives. Cependant, 2 souches pigmentées, *M. phlei* et *M. rabinowitschi*, ont présenté une réaction assez nette en Dubos, étant négatives sur Jensen. Une douteuse sur Jensen.

Nocardia : 1 *asteroides*, 3 *brasiliensis*, 1 *farcinica*, 2 *pelletieri*, 1 *rhodocrans*, sont négatives. Néanmoins, *N. asteroides*, négative sur Jensen, a donné une réaction assez nette en Dubos.

Corynebacterium : 1 souche indéterminée, négative.

DISCUSSION ET CONCLUSION.

La réaction de Konno, par sa simplicité, mérite de passer dans la pratique courante du laboratoire d'analyses médicales. Cependant, elle doit être interprétée avec prudence en tenant compte du milieu, de l'âge et de la luxuriance de la culture. Toutes les Mycobactéries en effet, et des *Nocardia*, produisent de l'acide nicotinique ; il n'existe entre les diverses espèces que des différences de degré.

Le test ne doit être considéré comme positif que si, dans les conditions optima, on obtient constamment une réaction nette. Les

cultures que nous recevons aux fins d'identification sont souvent pauvres, les colonies difficiles à détacher. Il faut tout d'abord assurer le repiquage en trois points sur un milieu de Jensen, Jensen pyruvate ou Coletsos, qui sera éprouvé valablement après un mois d'étuve. Néanmoins, on pourra essayer d'orienter les recherches en effectuant la réaction sur des colonies détachées si elles sont différentes, ou mieux, sur le milieu même si la culture est homogène. Une légère teinte jaune peut donner une indication, non une certitude.

Sur les 168 souches humaines éprouvées, nettement positives dans leur ensemble, les 4 INH résistantes douteuses présentaient en réalité des cultures assez pauvres, la réaction étant très faible plutôt que négative. Peut-être avec un milieu plus favorable aurions-nous obtenu des résultats plus nets. Les souches humaines négatives de Jensen et Kiaer [41] étaient fortement INH résistantes. D'autre part, Villett [27] trouve davantage d'acide nicotinique dans le filtrat de la souche H37Rv INH résistante à plus de 10 µg que dans le filtrat de la souche sensible. Les 3 souches humaines négatives de Tacquet, Tison et Macquet sont résistantes à 0,5 µg seulement.

Pour les souches bovines qui produisent moins de nicotinamide que les humaines, on sait que des souches de collection réagissent comme les humaines, ce que nous avons vérifié pour 2 souches sur 7. Dans la pratique, le test de Konno est intéressant pour identifier, lors de l'isolement, les souches rugueuses ou en phase intermédiaire. Bien des souches d'apparence plus ou moins lisse se révèlent comme des humaines. Pour les souches dysgoniques, le repiquage sur un milieu favorable est nécessaire. Il peut s'agir d'une souche bovine mais aussi, à l'heure actuelle, d'une souche humaine, le plus souvent INH résistante. Nous avons noté, sur milieu au pyruvate, deux souches bovines dysgoniques lisses sur Jensen, donnant des réactions ou très faibles ou nulles. Présentement il ne saurait être question de remplacer l'épreuve de virulence comparée, qui demeure la base de la sélection humain-bovin, par la recherche de l'acide nicotinique.

La réaction peut être très utile pour établir, non pas l'identité, mais la probabilité du BCG, tout au moins en France, la souche de l'Institut Pasteur étant négative. C'est ainsi qu'une souche ne tuberculisant pas le cobaye avec 1 mg, catalase-positive, Konno-négative, avec antécédent vaccinal, sera très probablement le BCG. Il n'en va pas de même avec le BCG de certains Instituts étrangers ; la souche Moscou, par exemple, donne une réaction positive sur les cultures de plusieurs mois sur Jensen et en Dubos.

Fait intéressant, le bacille de Wells donne, pour nos 3 souches, une réaction nettement positive. Runyon et coll. [24] avaient fait la même observation sur une souche. Cette particularité tend à

rapprocher cette espèce du bacille humain plutôt que du bacille bovin, comme le faisaient certains auteurs.

Nos 16 souches aviaires, de collection pour la plupart, sont demeurées constamment négatives aussi bien sur Jensen qu'en Dubos : de même 2 souches de *M. johnei* sur Jensen à l'extrait de fléole.

Contrairement à celle de Runyon, notre souche de *M. ulcerans* n'a présenté en culture sur Jensen, que des réactions très faibles ou nulles. Il semble qu'il existe une certaine disparité parmi les souches de cette espèce ; c'est ainsi que Meissner [20] fait mention d'une souche cultivant à 45°, alors que la nôtre doit être entretenue au-dessous de 37°.

Chez 77 paratuberculeux, une souche récente présente sur Jensen des réactions négatives ou de moyenne intensité ; 1 *M. phlei*, 1 *M. rabinowitschi*, *Nocardia asteroides* 318, négatives, même en cultures âgées, sur Jensen, donnent des réactions assez nettes en Dubos de quarante-quatre jours.

RÉSUMÉ.

La réaction de Konno est effectuée directement sur des cultures obtenues sur milieu de Jensen ensemencé en trois points, après un séjour d'un mois à l'étuve. Les souches bovines dysgoniques lisses sont cultivées sur milieu au pyruvate.

Sur 168 souches humaines, 162 sont positives, 5 douteuses, 1 négative : H37RvD. Sur 26 bovines, 2 douteuses, 2 souches de collection sont positives. 1 souche de BCG sur 12 (Moscou) est positive. 3 souches de bacille de Wells sont nettement positives. 1 *M. ulcerans* donne une réaction douteuse. 16 aviaires, 1 *M. balnei*, 2 *M. fortuitum* sont négatifs. Sur 74 paratuberculeux dont 3 photochromogènes : 1 douteux, les autres négatifs. Huit *Nocardia* et 1 Corynébactérie ne réagissent pas.

La réaction de Konno, par sa simplicité, mérite de passer dans la pratique courante du laboratoire d'analyses médicales. Cependant elle doit être interprétée avec prudence, en tenant compte du milieu, de l'âge et de la luxuriance de la culture.

SUMMARY

IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA BY THE DEMONSTRATION OF NICOTINIC ACID.

Konno's reaction is carried out on cultures on Jensen's medium, seeded at three points, and kept a month in the incubator. Bovine smooth dysgonic strains are cultivated on pyruvate medium.

From 168 human strains, 162 are positive ; 5 are dubious ; 1 is negative (H37RvD).

From 26 bovine strains, two are dubious, 2 collection strains are positive.

One strain of BCG out of 12 (Moscou) is positive ; 3 strains of Wells bacillus are positive ; 1 strain of *M. ulcerans* is dubious ; 16 avian strains, 1 *M. balnei* and 2 *M. fortuitum* are negative.

From 74 paratuberculous strains (3 of which are photochromogeneous) 1 is dubious, the other ones are negative.

Eight *Nocardia* and one *Corynebacterium* are negative.

Konno's reaction is very simple and should be used in routine laboratory practice. However, it must be cautiously interpreted, and the nature of the medium, the age and the abundance of the culture must always be kept in mind.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ASMUS (E.) et GARSCHAGEN (H.). *Z. Anal. Chem.*, 1953, **139**, 81.
- [2] BOENICKE (R.). *Jber. Tuberk. Forsch.*, 1956-1957, 137.
- [3] BOENICKE (R.) et LISBOA (B. P.). *Tuberkulosearzt*, 1958, **12**, 380.
- [4] BOENICKE (R.). *Bull. Un. int. Tub.*, 1959, **29**, 83.
- [5] COLETSOS (P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1959, **248**, 3497.
- [6] CURATORA (G.) et MARCHESINI. *Nuov. Ann. Ig. Microbiol.*, 1956, **7**, 188.
- [7] FEINSTEIN (L.). *Science*, 1945, **101**, 675.
- [8] GILANI (S.) et SELKON (J. B.). *Tubercle*, 1958, **39**, 396.
- [9] GRABENDORFER-QUINCKE (E.). *Beitr. klin. Tuberk.*, 1959, **120**, 150.
- [10] JENSEN (K. A.) et KIAER (I.). *Bull. Un. Int. Tub.*, 1957, **27**, 166.
- [11] JENSEN (K. A.) et KIAER (I.). *Bull. Un. Int. Tub.*, 1958, **28**, 165.
- [12] KOCH (M. L.) et KROLL (A. W.). *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1960, **81**, 108.
- [13] KONNO (K.). *Proc. imp. Acad. Japan*, 1953, **29**, 289.
- [14] KONNO (K.). *Science*, 1956, **124**, 985.
- [15] KONNO (K.), KURZMANN (R.) et BIRD (K. T.). *Amer. Rev. Tub.*, 1957, **75**, 529.
- [16] KONNO (K.), KURZMANN (R.), BIRD (K. T.) et SBARRA (A.). *Amer. Rev. Tub.*, 1958, **77**, 669.
- [17] KONNO (K.). *Beitr. klin. Tub.*, 1958, **119**, 1.
- [18] KONNO (K.) et SBARRA (A.). *Amer. Rev. Tub.*, 1959, **79**, 810.
- [19] MAREK (A.). *Beitr. klin. Tub.*, 1957, **117**, 529.
- [20] MEISSNER (G.). *Beitr. klin. Tuberk.*, 1959, **120**, 810.
- [20 bis] MEDVECZKY (E.). *Nature (Lond.)* 1960, **186**, 332.
- [21] PECKNICE (J. R.). *Csl. Farmac.*, 1953, **2**, 354.
- [22] POPE (H.) et SMITH (D. T.). *Amer. Rev. Tub.*, 1946, **54**, 559.
- [23] RUNYON (E. H.). *Amer. Rev. Tub.*, 1955, **72**, 866.
- [24] RUNYON (E. H.), MERLE (J. S.) et HARRIS (H. Wm.). *Amer. Rev. Tub.*, 1959, **79**, 663.
- [25] STONEBRINK (B.). *Bull. Off. int. Epizooties*, 1952, **37**, 662.
- [26] TACQUET (A.), TISON (F.) et MACQUET (V.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1958-1959, **10**, 223.
- [27] VILLETT (M. B.). *Amer. Rev. Respir. Dis.*, 1959, **80**, 404.

LES ADÉNOVIRUS

ÉTUDE DE 17 SOUCHES ISOLÉES A TOULOUSE

par Lise ENJALBERT, Jacqueline DIDIER (*), Marie-Blanche LARENG
et Lydia LAPCHINE (**) (***).

(Chaire de Bactériologie et d'Hygiène de la Faculté de Médecine
de Toulouse [professeur ANDRIEU])

Ces 17 souches d'adénovirus ont été isolées en deux ans à Toulouse (mars 1958 à mars 1960), dans une population d'enfants et d'adultes dont les seuls points communs sont d'être : des *malades*, souvent gravement atteints, et des *civils*.

L'étude des virus isolés est théoriquement facile jusqu'au diagnostic de virus « adéno », la reconnaissance du sérotype est plus laborieuse. Avec l'aide du Service des Virus de l'Institut Pasteur (Dr Lépine) nous avons cependant tenté de voir si nos adénovirus languedociens trouvaient place dans le répertoire donné par Rowe et Huebner en 1958.

ÉTUDE VIROLOGIQUE.

Pendant deux ans l'examen de 874 prélèvements d'origine humaine, tous cultivés sur cellules HeLa (Gey), nous a donné 128 virus parmi lesquels : 17 adénovirus, 74 poliovirus, 15 ECHO, 6 Coxsackie B et 14 virus cytopathogènes non identifiés.

Nos 17 souches d'adénovirus représentent donc 1,9 p. 100 du nombre des examens et 13,2 p. 100 du nombre des virus cytopathogènes isolés.

Dans 430 prélèvements de gorge, nous avons rencontré six fois un adénovirus.

Dans 195 prélèvements de selles, nous avons rencontré deux fois un adénovirus.

Dans 230 liquides céphalo-rachidiens bactériologiquement stériles, nous avons rencontré six fois un adénovirus.

(*) Attachée de Recherche C. N. R. S.

(**) Attachée de Recherche I. N. H.

(***) Manuscrit reçu le 12 mai 1960.

Dans 16 prélèvements de conjonctivite aiguë, trois fois un adénovirus a été isolé.

ISOLEMENT. — Tous les ensemencements sont faits sur cellules HeLa (en surveillant les effets toxiques pour les selles et les milieux de transport). Examen des tubes tous les deux jours, et changement de milieu après la lecture, pendant quinze jours. Les deuxième et troisième passages suivent les mêmes règles. Il a été préparé au laboratoire, et employé pour ce travail plus de 10 000 tubes de culture de la souche HeLa, parmi lesquels 256 seulement (2 tubes sont ensemencés par prélèvement) ont montré un effet cytopathogène inattendu puisqu'il s'agissait d'un nouveau virus. Cette proportion écarte la notion d'une souillure virale de notre souche HeLa, et, de plus, les colorations de témoins HeLa non inoculés accompagnent toujours les colorations de cellules lésées pour que la comparaison soit faite à tous les grossissements, au cours des différents passages.

Dès l'effet cytopathogène obtenu (premier passage, quatre fois ; deuxième passage, dix fois et troisième passage, trois fois), le virus est identifié. Son insensibilité à l'éther vérifiée, *il est mis en présence des antisérums polio, Coxsackie, ECHO*. Les neutralisations ont toujours été négatives. Le virus est aussi employé pour *réaction de fixation du complément en face d'un sérum anti-adéno*.

Les taux de déviation de nos 17 souches d'adénovirus sont toujours faibles dans les premiers passages en cultures de tissus et augmentent lors des repiquages. Ils vont de 1/4 à 1/32. Notons que les antigènes préparés avec les souches répertoriées d'adénovirus ne donnent que des taux comparables (1/8 à 1/32).

Enfin, le virus est observé dans son effet cytopathique (planche I). Cet examen porte sur l'aspect de la *nappe cellulaire*, sans coloration. Nous avons constaté onze fois le réseau classique et six fois l'absence de mailles dans la nappe faite de cellules arrondies.

Vient ensuite l'examen des *cellules colorées* pour recherche des lésions intranucléaires caractéristiques. Nous utilisons la méthode de l'enrobage des cellules, colorées sur la paroi du tube, dans un film de collodion. Cette technique nous permet de colorer directement les premiers tubes de culture où se montre la lésion cellulaire, par l'habituel hémalum-éosine (ou hématoxyline-phloxine). Les altérations nucléaires sont visibles dès vingt-quatre à quarante-huit heures pour la plupart de nos souches, à l'immersion, sous forme de petites inclusions éosinophiles entourées d'un halo clair.

Cette lésion précoce siège dans un noyau granuleux dont les nucléoles sont encore respectés. Après elle, et à côté d'elle, se

voient les lésions cytologiques plus avancées, décrites en France par Lépine, Barski, Sohier, Chany. Le nombre des inclusions augmente rapidement, elles remplissent le noyau dont la périphérie s'éclaire d'un halo clair [2, 5, 6, 16, 17, 18, 30].

Sur HeLa, cette zone vacuolaire et l'aspect rétracté du noyau sont peu différents d'un virus à l'autre. Il est vrai que pour nos 17 souches les inclusions intranucléaires sont plus ou moins nombreuses, plus ou moins grosses, plus ou moins régulières, et leurs vacuoles plus ou moins grandes et nombreuses. Mais chaque fois que nous avons tenté de ranger un de nos adénovirus d'après l'aspect de cette lésion tardive du HeLa, nous avons eu une déception. Nos trois adénovirus du type 7, par exemple, donnent une rétraction en maille de la nappe cellulaire, les inclusions intranucléaires sont vite confluentes, acidophiles, les vacuoles ne sont jamais très claires et l'image « en fleur » peu évidente.

Les seuls adénovirus pour lesquels nous avons la notion d'une infection épidémique ne donnent pas non plus de larges vacuoles ni de rétraction compacte du noyau, la nappe cellulaire, par contre, est rétractée sans mailles. Il nous semble difficile de dépasser, d'après l'aspect de la lésion cellulaire colorée, la notion de *présence* d'un adénovirus en employant les cellules HeLa. La reconnaissance approchée du type nous paraît pleine d'embûches et trop subjective.

CLINIQUEMENT. — Ces 17 adénovirus proviennent de 16 malades (7 enfants et 9 adultes) pour lesquels la symptomatologie et les antécédents respiratoires ne sont pas toujours retrouvés.

a) 6 souches proviennent de la gorge. Nous trouvons 5 « gripes », dont trois accompagnées de pneumopathies aiguës (G 128, G 408, G 63) et une pharyngite avec conjonctivite (G 474).

b) 2 souches sont isolées des selles dans une gastro-entérite fébrile d'enfant dont le frère et le cousin sont porteurs de conjonctivite à adénovirus (S 1689), et un syndrome de Guillain-Barré récidivant après vingt-huit ans chez un adulte (S 1604).

c) 5 souches isolées dans des L. C.-R. proviennent de culture avant toute congélation et conservation du L. C.-R.

En 1958, une seule souche d'adénovirus a été trouvée (L 23) chez un enfant atteint de syndrome poliomyélitique à paralysies régressives. Les sérums du malade neutralisent cet adénovirus à un taux élevé et croissant.

En 1959, les 5 souches isolées le sont toutes entre juillet et octobre avant que notre région commence à subir une augmentation nette de la morbidité poliomyélitique.

L 150 : syndrome paralytique ascendant mortel chez un éthylique (cell., 4 ; alb., 0,10).

L 158 : paraplégie flasque, opérée plus tard pour tumeur de la moelle, décès (cell., 1 ; alb., 0,25 ; chlores, 7,10 ; glucose, 0,65 g).

L 185 : poliomyélite grave, enfant mort en quarante-huit heures sans aucun autre examen virologique (absence de poliovirus dans ce L. C.-R. (cell., 80 ; lymphocytes ; alb., 0,80 ; chlores, 6,35 g).

L 186 : adulte, épisode fébrile, subictère, douleurs musculaires. Considéré comme une grippe (cell., 1 ; alb., 0,20).

L 190 : poliomyélite paralytique, avec présence de poliovirus III dans les selles seulement (cell., 405 dont 230 polynucéaires et 175 lymphocytes ; alb., 1 g ; chlores, 7,35 g).

d) Enfin, 3 souches sont d'origine conjonctivale :

O 3 : adulte avec conjonctivite aiguë, pharyngite et adénopathie cervicale ;

O 16 : enfant avec conjonctivite simple.

O 12 : enfant présentant un véritable syndrome adéno-pharyngo-conjonctival, de la gorge duquel est aussi isolé un adénovirus (G 474).

Ces conjonctivites représentent notre seule certitude, épidémiologique. Trois enfants d'une même famille ont, en janvier 1960, présenté un état pathologique aigu ;

Robert, 1 an, conjonctivite aiguë ;

Alain, 3 ans, gastro-entérite fébrile ;

Jacques, 3 ans, adénopharyngo-conjonctivite, a été le premier atteint. Pour tous nos autres adénovirus, aucune notion épidémique ne peut être retrouvée dans les observations. Notons que tous ces malades ont eu une réaction de Hirst négative pour les virus grippaux, et une recherche d'ornithose-psittacose négative.

ETUDE SÉROLOGIQUE.

Les études sérologiques que nous avons pu faire sont limitées par le petit nombre de paires de sérums obtenues, soit en raison de l'évolution trop bénigne, soit parce que la mort est survenue très vite.

Pour 6 malades, les sérums ont été étudiés par séro-neutralisation (quatre fois) et déviation du complément (six fois). Ces sérums prélevés en moyenne au début et vers le douzième jour de l'évolution nous ont donné des résultats dissociés, l'épreuve de neutralisation est positive et la déviation de complément négative [deux exceptions] (tableau I).

INTERPRÉTATION. — D'après les travaux de Sohier [22] fixant les taux de positivité de la *fixation du complément* dans les infections à adénovirus, une seule de nos réactions est fortement posi-

tive (G 63). C'est aussi le seul malade pour lequel les prélèvements sont étalés entre le dixième et le vingt-quatrième jour après le début de l'infection.

Une autre réaction (O 3) est à considérer comme positive en raison de l'augmentation du taux de $1/2$ à $1/16$.

Pour tous les autres malades du tableau I, l'épreuve de fixation du complément est négative, les prélèvements de sérums ne sont jamais très tardifs. Quatre de nos malades ont cependant des taux de *séroneutralisation* positifs pour leur propre virus, au septième jour après l'ensemencement, alors que dans les témoins-virus l'effet cytopathogène est net depuis le troisième jour. Bien que la séroneutralisation soit considérée comme hautement spécifique par Jawets [13], Werner et Hilleman [12, 7], Van Horne [23], Grayston [10], Bennett [4], nous n'osons pas affirmer, sur la présence du virus et la netteté des anticorps neutralisants, l'étiologie à adénovirus des quatre syndromes neurologiques présentés dans le tableau I.

ANTISÉRUMS PRÉPARÉS SUR L'ANIMAL. — Nous avons préparé avec huit de nos adénovirus un antisérum sur 8 lapins [24, 15].

La technique de la préparation est toujours celle de Grayston [9], dans laquelle le prélèvement du sérum utilisable se fait chez l'animal au quinzième jour après l'inoculation virale. Seul l'antisérum G 63 a été préparé avec prélèvement au trentième jour.

Comme pour les sérums de malades, nous retrouvons chez l'animal inoculé le non parallélisme entre les deux types de réaction servant à mettre les anticorps en évidence (tableau II).

Au quinzième jour, chez le lapin, après deux injections de 10 cm^3 de culture de virus (intraveineuse au jour 1, intrapéritonéale au jour 8) :

Cinq fois la séroneutralisation est fortement (+), la déviation du complément faible ($< 1/32$) ou présomptive ;

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Culture sur souche cellulaire HeLa. Adénovirus type 1 (souche G 455, troisième passage). Image classique en réseau. Gr. $\times 60$.

FIG. 2. — Culture sur souche cellulaire HeLa. Adénovirus type 3 (souche O 12, deuxième passage). Image de lésion sans rétraction ni réseau ; foyers disséminés. Gr. $\times 60$.

FIG. 3 et 4. — Culture sur HeLa d'adénovirus type 1 (souche L 186, cinquième passage). Corps d'inclusion intranucléaire mûriforme, souvent détaché de la membrane nucléaire. Nucléoles intacts entourés de halo clairs. Gr. $\times 200$ et $\times 800$.

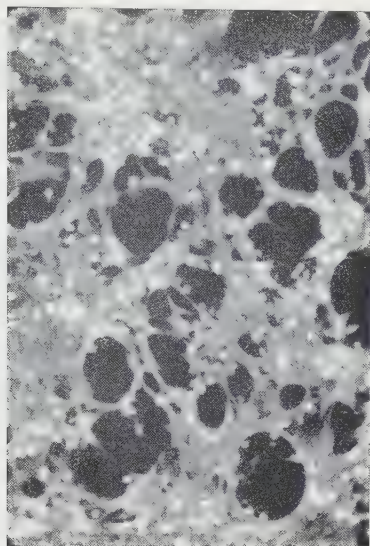


FIG. 1.

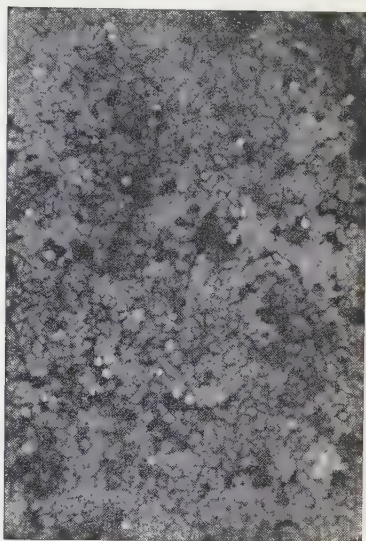


FIG. 2.

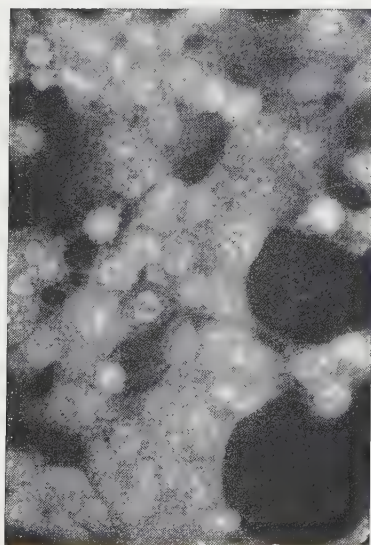


FIG. 3.

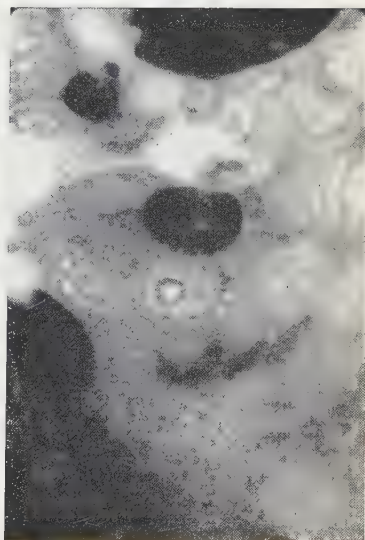


FIG. 4



TABLEAU I. — Etude des réactions sérologiques (séro-neutralisation, fixation du complément) portant sur les sérums des malades chez lesquels a été isolé un adénovirus.

Souche N°	Clinique	Origine Virus	Jour maladie	Dates Prélèvements Sérums	Séro-neutralisation	Déviatiion Complément	Type Du Virus
G 63 Avril 1958	P.A.P.	Gorge 17 - 5 - 58	10 15 24	13 - 5 - 58 17 - 5 - 58 26 - 5 - 58	/	1/128 1/256 1/64	Adénovirus 7
O 3 Avril 1958	Conjonctivite Pharyngite Adénopathies cervicales	conjonctive 10 - 4 - 58	2 à 4 14 env.	10 - 4 - 58 22 - 4 - 58	/	< 1/2 1/16	Adénovirus 4
L 23 Sept. 1958	Poliomyélite précédée de rhino-pharyngite	L.C.R. 18 - 8 - 58	15 ? 23 ?	12 - 9 - 58 20 - 9 - 58	1/50 ≥ 1/100	1/2 + 1/4	Adénovirus 1
L 186 Oct. 1959	Grippe ? douleurs musculaires précédées de diarrhée	L.C.R. 15 - 10 - 59	2 10	13 - 10 - 59 21 - 10 - 59	1/50 ≥ 1/100	< 1/2 épuisé	Adénovirus 1
L 190 Oct. 1959	Poliomyélite paralytique	L.C.R. 15 - 10 - 59	5	20 - 10 - 59	≥ 1/100	/	Adénovirus 1
S 1604 Janv. 1960	Gullain-Barré (récidive)	Selles 11 - 1 - 60	1 ? 13 ?	5 - 1 - 60 18 - 1 - 60	1/10 1/50	< 1/2 < 1/2	Adénovirus 7

Deux fois la séroneutralisation est négative, la déviation positive au 1/128 avec la restriction d'une déviation par antigène normal à un taux élevé.

Au trentième jour l'antisérum G 63 préparé avec une technique différente donne les deux réactions positives.

TABLÉAU II. — Etude des antisérums de lapin préparés avec 8 souches d'adénovirus isolées chez l'homme (séro-neutralisation, fixation complément).

Antisérum : lapin	Jour du Prélèvement	Séro- neutralisation :(virus du malade)	Déviation du complément Virus du malade : Adeno 7 : Adeno 9
G 63 (Adeno 7)	30e	$\geq 1/320$	$1/64$ AN = 1/32 : 1/256 1/128
G 128 (Adeno 1)	15e	$\geq 1/1000$	$< 1/2$ / /
G 408 (Adeno 1)	15e	$\geq 1/1000$	$1/16$ AN = 0 / /
G 455 (Adeno 1)	15e	$< 1/10$	$1/128$ AN = 1/64 /
O 16 (Adeno 3)	15e	$\pm 1/1000$	$1/32$ AN = 8 / /
L 185 (Adeno 1)	15e	$1/1000$	$< 1/2$ / /
L 186 (Adeno 1)	15e	$\geq 1/1000$	$1/32$ AN = 1/16 1/32 1/32
L 190 (Adeno 1)	15e	$< 1/10$	$1/128$ AN = 1/64 / /

Une réaction comparable existe peut-être dans l'organisme humain, la recherche d'infection par les adénovirus demande des prélèvements plus tardifs que pour la recherche sérologique de la grippe, prise souvent pour modèle de dossier virologique. Dans tous les cas où la fixation du complément est positive à un taux élevé, elle semble avoir une très grande valeur de preuve de l'infection par l'adénovirus.

La recherche *du type* de nos souches a été conduite en deux temps. Dans un *premier temps* chaque antisérum de lapin préparé a été mis en présence de 13 types d'adénovirus de collection venus de l'Institut Pasteur (D^r Lépine), des Etats-Unis (D^r Kibricks) et de Copenhague (D^r H. von Magnus). Nous ne possédons pas les types 8, 13, 16 et 17.

Dans un *deuxième temps*, les mêmes antisérums de lapins ainsi identifiés ont été mis en présence de nos 17 souches pour chercher les réactions croisées possibles. Celles-ci nous ont permis de reconnaître :

3 souches de type 7 (G 63, L 158 et S 1604) ;

3 souches de type 3 (O 16, O 12 et S 1689).

Toutes nos souches ont été ensuite envoyées pour identification de type au Service des Virus de l'Institut Pasteur (D^r Chany). Nous avons à ajouter à nos résultats confirmés :

1 souche de type 4 (O 3) ;

9 souches de type 1 (G 408, G 455, L 185, L 186, L 190, L 150, L 23, G 128 et G 245).

Cette étude du type de nos souches d'adénovirus nous donne une forte majorité de type 1. L'un des caractères principaux de l'infection par certains adénovirus, dont le type 1, est la persistance du virus dans le tissu lymphoïde pharyngé, dépendant peut-être d'une infection survenue dans l'enfance. Ceci explique que nous hésitions à accepter le pouvoir pathogène certain de cet adénovirus rencontré dans L. C.-R., chez quatre malades différents, sans notion de contagion. Nous retrouvons quelquefois, en bactériologie humaine, lors d'une agression microbienne ou non, le streptocoque α pharyngé dans le L. C.-R. biologiquement peu perturbé. Ce passage de la barrière méningée pourrait aussi se produire pour les adénovirus reconnus hôtes persistants du rhinopharynx.

Cette notion nous intéresse tout particulièrement, bien que les problèmes de la pénétration et de la survie de l'adénovirus 1 dans le L. C.-R. ne soient pas, à notre connaissance, évoqués souvent dans l'épidémiologie de ces virus.

Trois souches sont du type 3, elles proviennent de la même épidémie familiale classique, groupant chez des enfants une conjonctivite, un syndrome pharyngé aigu et une infection intestinale.

Trois souches sont du type 7. L'une est rencontrée dans la gorge d'une pneumopathie « grippale » certainement due à cet adénovirus. Les deux autres viennent de syndromes neurologiques graves.

Une souche est du type 4, il s'agissait d'une adénopharyngo-conjonctivite aiguë non microbienne.

RÉSUMÉ. — Cette étude des adénovirus isolés en deux ans, au cours d'une recherche systématique de virologie médicale nous a montré combien ce point en apparence facile, parce que le virus se manifeste aisément sur cellules HeLa, n'est pas totalement éclairci.

Nous avons retrouvé les adénovirus en *pathologie respiratoire aiguë*, dans les syndromes *adéno-pharyngo-conjonctivaux* typiques au cours desquels l'épreuve de séroneutralisation positive dès le dixième jour précède nettement la réaction de fixation du complément dont il faut rechercher la positivité jusqu'au trentième jour.

Nous avons aussi rencontré des *syndromes neurologiques* graves dans lesquels les adénovirus sont présents sans que leur rôle étiologique et diagnostique puisse être affirmé. L'ubiquité et la latence du portage d'adénovirus, de type 1 en particulier, sont reconnues comme fréquentes chez l'homme, et nos résultats apparaissent comme une conséquence logique de cette notion.

SUMMARY

ADENOVIRUSES.

STUDY OF THE ADENOVIRUSES ISOLATED AT TOULOUSE.

The study of the adenoviruses isolated in two years, in the course of a general survey of medical virology, shows that many facts remain unexplained in spite of the easy development of these virus in HeLa cell cultures.

Adenoviruses were found in the course of acute respiratory diseases, of acute adeno-pharyngo-conjunctivitis syndroms, cases in which the seroneutralization is positive on the tenth day, preceding the complement fixation, which is positive only on the thirtieth day.

Adenoviruses were also found in severe neurological syndroms, in which their etiological role could not be demonstrated.

Human beings are often carriers of adenoviruses for a very long time, particularly of type 1, and the findings of the authors are in good agreement with this fact.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANDRIEU (G.), ENJALBERT (L.), LAPCHINE (L.) et DIDIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 421-429.
- [2] BARSKI (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 614-622.
- [3] BARSKI (G.) et CORNEFERT (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 724-731.
- [4] BENNETT (F. M.), LAW (B.), HAMILTON (W.) et MAC DONALD (A). *Lancet*, oct. 1957, 670-672.
- [5] BINN (L. N.) et HILLEMANN (M. R.). *J. inf. Dis.*, 1958, **103**, 127.
- [6] BOYER (G. S.), LEUTCHENBERGER (C.) et GINSBERG (H. S.). *J. exp. Med.*, 1957, **105**, 195-206.

- [7] DASCOMB (H. E.) et HILLEMANN (M. R.). *Am. J. Med.*, 1956, 161-174.
 - [8] DROUHET (V.), *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 138-142.
 - [9] GRAYSTON (J. T.), JOHNSTON (P. B.), SMITH (M. E.) et LOOSLI (C. G.). *J. inf. Dis.*, 1956, **99**, 188-198.
 - [10] GRAYSTON (J. T.), LASHOF (J. C.), LOOSLI (C. G.) et JOHNSTON (P. B.). *J. inf. Dis.*, 1958, **103**, 93-101.
 - [11] GRAYSTON (J. T.) et coll. *J. inf. Dis.*, 1959, **104**, 61-70.
 - [12] HILLEMANN (M. R.) et WERNER (J. H.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 183-188.
 - [13] JAWETZ (E.). *Ann. New York Acad. Sci.*, 1957, **67**, 279-286.
 - [14] JORDAN (W. S.). *Ann. New York Acad. Sci.*, 1957, **67**, 273-278.
 - [15] KIBRICKS (S.), MELENDEZ (L.) et ENDERS (J. F.). *Ann. New York Acad. Sci.*, 1957, **67**, 311-325.
 - [16] LÉPINE (P.), CHANY (Ch.) et ROBBE-FOSSAT (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 607.
 - [17] LÉPINE (P.), CHANY (Ch.), MAURIN (J.) et CARRÉ (M. C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 729.
 - [18] PRUNIERAS (M.), CHARDONNET (Y.) et SOHIER (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 798-800.
 - [19] SOHIER (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 222-225.
 - [20] SOHIER (R.), BENSIMON (P.), CHARDONNET (Y.), CHALLUT (F.) et FREYDIER (J.). *Rev. Hyg.*, 1957, **5**, 423-449.
 - [21] SOHIER (R.), BENSIMON (P.) et LAGABRIELLE (B.). *Bull. Mém. Soc. Hôp. Paris*, 25 janvier 1957, 37-42.
 - [22] SOHIER (R.), CHARDONNET (Y.) et FREYDIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, **98**, 204-211.
 - [23] VAN HORNE (R. G.), SASLAW (S.), ANDERSON (C. R.), FLALLEY (F. J.) et CARR (R. D.). *Arch. intern. Med.*, 1957, **99**, 70-73.
 - [24] WENNER (H. A.), BERAN (C. W.), WESTON (J.) et CHIN (T. D. Y.). *J. inf. Dis.*, 1957, **101**, 275-286.
-

ESSAIS DE TRAITEMENT DE LA MAMMITE STAPHYLOCOCCIQUE DE LA VACHE PAR VACCINATION LOCALE

par M. PLOMMET (*).

*(Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières,
C. N. R. Z., Jouy-en-Josas, S.-et-O.)*

Le traitement des mammites staphylococciques de la vache laitière par vaccination a été tenté à plusieurs reprises. L'anatoxine α , avec ou sans adjuvants, a d'abord été utilisée [1, 2] avec, semble-il, quelques succès [3]. Puis, après qu'il eût été reconnu que les staphylocoques de mammites produisent toujours la toxine β [4], on a utilisé un mélange d'anatoxine α et d'anatoxine β additionné de corps microbiens, en particulier de staphylocoques appartenant aux différents groupes sérologiques [5]. Les vaccins de ce dernier type injectés par voie générale donnent lieu, chez la brebis et chez la vache, à une élévation importante mais temporaire du taux des anticorps antitoxiques et des agglutinines; les injections de rappel produisent une remontée rapide et forte de ce taux [6, 7]. Les résultats obtenus en pratique montrent une diminution notable du nombre des infections nouvelles et du nombre des formes aiguës dans les lots vaccinés par rapport aux lots témoins; toutefois, la vaccination ne fait pas disparaître les infections établies [8, 9, 10] et ne protège contre l'infection expérimentale ni la vache [11] ni la brebis [12]. Par contre, l'injection du vaccin dans la mamelle procure, chez la brebis, pendant une durée relativement courte, une immunité suffisante pour résister à une infection expérimentale massive [12, 13].

Le traitement des mammites staphylococciques de la vache par les antibiotiques donne des résultats inconstants. Dans nos essais, le pourcentage de guérisons dépasse rarement 50 p. 100. C'est pourquoi nous avons tenté de traiter ces infections par la vaccination en utilisant le vaccin et la méthode de Pillet [5, 12, 13]. Le vaccin utilisé titre 10 U/ml anatoxine α , 5 U/ml anatoxine β

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 mai 1960.

et renferme 6.10^9 corps microbiens par millilitre appartenant aux staphylocoques de type I, II et 8, ainsi que des souches d'origine animale. Dans un premier temps, nous avons utilisé la vaccination par voie générale qui ne nous a donné aucun résultat appréciable ; dans un deuxième temps, nous avons utilisé la voie locale en injectant le vaccin dans le quartier infecté par la voie du trayon. Ce sont les premiers résultats de ces essais que nous rapportons ici.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

1° ANIMAUX. — Les 15 vaches traitées appartiennent aux troupeaux expérimentaux du C. N. R. Z. (Jouy-en-Josas) ou de l'élevage du Breuil (Rosay-en-Brie, S.-et-M.). Dans ces troupeaux chaque vache est soumise chaque mois à au moins un examen bactériologique du lait ou de la sécrétion de chaque quartier prélevé aseptiquement.

2° MÉTHODE DE DIAGNOSTIC. — Le diagnostic bactériologique est établi par ensemencement de 0,02 ml de lait sur une demi-boîte de Petri de gélose au sang de mouton et incubation pendant quarante-huit heures à 37° C. Les staphylocoques qui cultivent sont classés en type β ou $\alpha\beta$, selon l'aspect de l'hémolyse sur le milieu [4]. Le diagnostic est complété, quand il est positif, par une numération cellulaire directe (méthode de Breed), ou indirecte (test au teepol de Schalm [14]). Après la mise en œuvre du traitement, le lait ou la sécrétion ont, d'une part été ensemencés comme ci-dessus, d'autre part enrichis par incubation directe ou dans du bouillon à 37° C pendant douze à quinze heures et ensemencés à nouveau. On a considéré comme infectées les vaches donnant au moins trois examens successifs positifs répartis sur un mois ; comme guéries, les vaches qui, après traitement, ont donné des échantillons de lait ne contenant pas de staphylocoques après incubation à au moins 3 contrôles répartis sur trois mois (2 vaches, éliminées prématurément du troupeau, n'ont été contrôlées respectivement que deux fois en trois mois et quatre fois en deux mois).

3° MÉTHODE DE TRAITEMENT. — Chaque vache reçoit le vaccin qui est injecté sans adjonction d'antibiotiques après la traite du soir dans le (ou les) quartier(s) infecté(s) [pas plus de 2 quartiers vaccinés lors d'un même traitement] à l'aide d'une sonde trayeuse, à la dose de 2,5 ml par quartier. On a fait deux, trois ou quatre injections à cinq à huit jours d'intervalle (certaines vaches étant contrôlées entre chaque injection, on a arrêté pour ces bêtes les injections dès stérilisation de la mamelle) ; en cas

de besoin, on a fait une deuxième et troisième série d'injections aux mêmes doses et au même rythme, un mois et demi à deux mois plus tard.

Après l'injection du vaccin, on observe pendant quelques jours une réaction inflammatoire forte ; sur les vaches en lactation, la production du quartier traité baisse considérablement : le minimum est atteint le deuxième jour ; la remontée s'effectue en cinq à six jours ; le lait prend un aspect séreux, quelquefois grumeleux, et renferme le deuxième jour environ 50.10^6 leucocytes par millilitre ; sa composition redevient normale en moins de huit jours. Sur les vaches en période sèche on note seulement un léger engorgement du pis pendant deux ou trois jours.

TABLEAU I. — Résultats de la vaccination intramammaire des vaches atteintes de mammite staphylococcique.

Résultats	N° des vaches	Nombre de séries d'injections	Type hémolyse Staph.	Ancienneté infections (en mois)	Nombre de traitements antérieurs	N° lactation	Mois de lactation au début du traitement	Durée du contrôle (en mois)
Guérison définitive	1 ^a	1	β	1		2	5ème	18
	2 ^a	1	$\alpha\beta$	6	4	3	6 "	15
	3	1	β	4	4	2	7 "	2 *
	4	3	β	3		1	5,7,9 "	18
	5	1	$\alpha\beta$	1		2	7 "	12
	6 ^a	2	β	1		3	3,5 "	3 *
	7	1	β	4	2	6	2 "	12
	8	2	$\alpha\beta$	8	1	2	T, T	6
	9	1	β	7	1	7	5	7
	10	1	β	12	1	3	2	6
Amélioration temporaire	11	1	$\alpha\beta$	12	2	6	2ème	
Echec	1 ^b	2	$\alpha\beta$	4		3	T, T	
	1 ^c	2	$\alpha\beta$	4		3	T, T	
	12	2	β	6	1	2	7, 8ème	
	6 ^b	3	$\alpha\beta$	1		3	3, 4, 6ème	
	13	4	$\alpha\beta$	1		2	1, 2, 4, 5 "	
	14	3	$\alpha\beta$	6		2	1, 1, 2 "	
	15	2	$\alpha\beta$	6	1	3	T, T	
	16	2	β	16	2	9	5, 7 "	

T : vache tarie au moment du traitement. (*) : contrôle de guérison interrompu prématurément.

RÉSULTATS.

Au total 19 quartiers (15 vaches) dont 6 avaient été traités auparavant et sans succès à une, deux, trois ou quatre reprises par différents antibiotiques, ont été traités : 7 quartiers ont été guéris définitivement au premier traitement, 2 au deuxième traitement et 1 au troisième traitement ; 1 quartier a présenté une amélioration clinique très nette, accompagnée d'une guérison bactériologique temporaire de deux mois après une série d'injections ; 8 n'ont pas été améliorés après deux (5 quartiers), trois (1 quartier) ou quatre (2 quartiers) séries d'injections ; dans ce cas, tous les contrôles faits après traitement (huit, quinze, trente jours) révèlent tous la présence de staphylocoques. Le détail des résultats figure au tableau I et montre que le succès ou l'échec du traitement est sans relation avec l'ancienneté de l'infection, le nombre des traitements antérieurs, le mois de lactation, le nombre de lactations antérieures ; par contre, le type hémolytique des staphylocoques semble, au moins en partie, responsable de ces résultats : sur 9 quartiers infectés par un staphylocoque β , on a obtenu 7 guérisons ; sur 10 quartiers infectés par un staphylocoque $\alpha\beta$, on n'a obtenu que trois guérisons.

DISCUSSION.

Le traitement par vaccination locale des mammites staphylococciques de la vache peut présenter un intérêt, puisque cette méthode nous a permis de guérir des infections pratiquement inguérissables par les antibiotiques ; cependant, le pourcentage élevé d'échecs et les réactions sur la production de lait des vaches en lactation en limite actuellement l'application à l'expérimentation ou au traitement des cas rebelles. La dose, le rythme et le nombre d'injections, l'association de la voie générale à la voie locale offrent de nombreuses possibilités qui sont peut-être susceptibles d'améliorer les résultats. Toutefois, chez la brebis, toutes les tentatives (9 brebis) que nous avons faites se sont soldées par des échecs.

Nous n'avons pas, dans ce travail, étudié le mécanisme de cette vaccination. Deux observations cependant laissent à penser qu'il s'agit d'un mécanisme à la fois spécifique et local : d'une part une vache (n° 7), infectée dans le même quartier à la fois par des staphylocoques et par des streptocoques, n'a été débarrassée par la vaccination que de ses staphylocoques ; d'autre part, deux vaches (n°s 1 et 6) infectées et traitées dans plusieurs quartiers n'ont réagi favorablement que dans un seul quartier. Ces obser-

vations renforcent l'hypothèse de Pillet [4], selon laquelle l'injection du vaccin dans la mamelle agit par un phénomène d'immunisation locale.

Le fait que les mammites dues aux staphylocoques de type hémolytique β guérissent plus facilement que celles dues aux staphylocoques du type $\alpha\beta$ appelle les remarques suivantes : la classification des souches en β et en $\alpha\beta$ par la méthode de diagnostic décrite et utilisant le sang complet de plusieurs animaux, est assez peu sensible ; les hémolyses α et δ sont confondues ; les souches faibles productrices de toxine α ne sont pas décelables : en fait, les souches désignées par β sont en réalité le plus souvent des souches $\alpha\beta$ à faible toxinogénèse α . Il n'en est pas moins vrai que cette différence quantitative de toxinogénèse α (ou δ) mise en évidence par la méthode existe réellement entre les souches étudiées et se retrouve d'un contrôle au suivant. On peut donc supposer que la toxine α (ou δ) produite par les souches résistantes au traitement est à l'origine de cette résistance ; la raison en est sans doute dans le type même de lésion provoquée par la toxine ; on sait que la toxine β pure, c'est-à-dire non associée aux toxines α et δ , n'a dans la mamelle qu'un rôle pathogène relativement modeste [15]. Il est donc probable qu'en améliorant l'immunisation contre la toxine α , on doit obtenir un meilleur résultat.

RÉSUMÉ.

Le traitement des mammites staphylococciques chroniques de la vache par injection dans la mamelle d'un mélange d'anatoxines α et β et de staphylocoques tués permet d'obtenir 50 p. 100 de guérisons définitives, même dans le cas d'infections anciennes ayant résisté à plusieurs traitements par les antibiotiques appropriés. Les résultats semblent en relation avec la plus ou moins grande toxinogénèse α des souches de staphylocoques infectantes.

SUMMARY

PRELIMINARY STUDIES ON THE TREATMENT OF STAPHYLOCOCCAL MASTITIS IN COWS BY MEANS OF A LOCAL IMMUNIZATION.

The author describes the first results obtained in the treatment of mastitis by means of the injection into the udder of α and β anatoxins + microbial bodies, according to the method proposed by J. Pillet for the prevention of staphylococcal mastitis in sheep.

In 50 % of the cases, the animals recovered. Some of them had already been unsuccessfully treated with several antibiotics.

There is no relationship between the result of the treatment and the age of the infection, the age of the cow or the lactation period. But the toxic type of *Staphylococcus* seems to be partially responsible for this result : *Staphylococci* which chiefly produce β toxin and only traces of α and δ toxins, are more often destroyed by the treatment.

The mechanism of the recovery, and particularly the part played by the local immunization, has not been studied.

★ ★

Nous tenons à remercier M. J. Pillet, qui est à l'origine de ce travail, de l'intérêt qu'il a porté à sa réalisation. Nous remercions aussi MM. B. Sevel et M. Bon de leur précieuse collaboration.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] RICHOU (R.) et HOLSTEIN (G.). *Rev. Imm.*, 1941, **6**, 363-380.
- [2] RICHOU (R.), HOLSTEIN (G.) et RENAULDON (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **85**, 789-791.
- [3] RICHOU (R.) et HOLSTEIN (G.). *Rec. Méd. vét.*, 1941, **117**, 329-338.
- [4] PILLET (J.), ORTA (B.), ISBIR (S.) et MERCIER (P.). *Bull. Acad. vét.*, 1950, **23**, 403, 407.
- [5] PILLET (J.), ORTA (B.), ISBIR (S.) et MERCIER (P.). *Bull. Acad. vét.*, 1950, **23**, 409-412.
- [6] PILLET (J.). (Résultats non publiés.)
- [7] RAMON (G.), RICHOU (R.), JULIENNE (P.), JACQUET (J.) et GERBAUX (C.). *Bull. Off. intern. Epizoot.*, 1952, **57**, 145-163.
- [8] SLANETZ (L. W.), BARTLEY (C. H.) et ALLEN (F. E.). *J. amer. vet. med. Assoc.*, 1959, **134**, 155-161.
- [9] PEARSON (J. K.). *J. Dairy Res.*, 1959, **26**, 9-16.
- [10] PLOMMET (M.). (Résultats non publiés.)
- [11] SPENCER (G. R.), STEWART (J. H.) et LASMANIS (J.). *Amer. J. vet. Res.*, 1956, **17**, 594-598.
- [12] PILLET (J.), GIRARD (O.), DUTHEIL (H.) et ORTA (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 365-368.
- [13] PILLET (J.), GIRARD (O.), DUTHEIL (H.) et ORTA (B.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 591-600.
- [14] SCHALM (O. W.) et NOORLANDER (B. S.). *J. amer. vet. med. Assoc.*, 1957, **130**, 199-204.
- [15] SLANETZ (L. W.) et BARTLEY (C. H.). *J. inf. Dis.*, 1953, **92**, 139-151.

LIVRES REÇUS

Effets génétiques des radiations chez l'homme. Rapport d'un groupe d'études. 1 vol., 184 p., O. M. S., Genève, 1957.

Cet ouvrage contient les communications présentées par les membres du groupe d'études réunis par l'Organisation Mondiale de la Santé, relatives aux effets génétiques de l'irradiation. Leur intérêt est inégal. Elles fournissent, cependant, un très grand nombre de renseignements utiles.
G. M.

A. S. Parkes et A. U. Smith. — *Recent research in freezing and drying.* 1 vol., 320 p., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1960.
Prix : 63 s.

Le II^e Congrès de « Congélation et Dessiccation » a eu lieu à Londres en 1958 ; les principales communications qui y ont été présentées font l'objet des différents chapitres de cet ouvrage. Ceux-ci ont été groupés en cinq parties qui sont les suivantes : I. Etude physique de la congélation dans le cas des systèmes biologiques. II. Congélation des organismes vivants. III. Etude physique des phénomènes mis en jeu au cours de la lyophilisation. IV. La lyophilisation appliquée aux microorganismes (BCG, virus, levures). V. Lyophilisation des tissus de mammifères.

La diversité des nationalités des participants à ce congrès montre l'importance qu'a prise depuis ces dernières années l'étude de la congélation, suivie ou non d'une dessiccation, appliquée à différents systèmes biologiques.
M. B.

Bibliographie de la Bilharziose 1949-1958. Organisation Mondiale de la Santé, 1960, 158 p. Prix : Fr. s. 6,-. (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris.)

J. Fournier et L. Chambon. — *La mélioiïdose et le bacille de Whitmore.* 1 vol., 106 p., 12 microphotos, Edit. méd. Flammarion, Paris, 1958.
Prix : 14 NF.

L'ouvrage comporte une première partie consacrée à l'épidémiologie et à l'épizootologie, partie où est exposée tout d'abord la répartition géographique de cette maladie longtemps localisée au sud-est asiatique et qui a envahi récemment certaines zones tropicales d'Australie et d'Amérique. Suivent des considérations sur les sources et sur les modes de contagion, où sont relatées les expériences des auteurs établissant l'origine tellurique de l'infection. Quant aux formes épidémiologiques, chez l'homme, c'est toujours la sporadicité ; mais, chez les mammifères domestiques, des épizooties meurtrières se produisent dans des circonstances examinées par les auteurs.

La seconde partie décrit les formes cliniques chez l'homme et chez les mammifères, et les méthodes bactério-immunologiques de diagnostic auxquelles les auteurs ont apporté leur contribution. Les observateurs font ressortir l'action thérapeutique du chloramphénicol.

La troisième partie est consacrée à l'étude du bacille de Whitmore. Elle contient un sommaire des travaux poursuivis dans ce domaine par les auteurs et par leurs prédécesseurs à l'Institut Pasteur de Saïgon. La structure antigénique (antigène K de Chambon, antigène O, antigène M, etc.) et la sensibilité aux antibiotiques sont l'objet de développements particuliers. Les auteurs prennent position dans le débat sur la situation taxonomique du bacille de Whitmore.

Dans une quatrième partie, les auteurs envisagent la prophylaxie de la mélioïdose. L'importance économique des épizooties chez les ovins caprins et porcins, et le danger qu'elles constituent pour la santé publique, font souhaiter que se poursuivent les recherches sur la vaccination.

J. F.

P. Grabar et P. Burtin. — *Analyse immuno-électrophorétique. Applications aux liquides biologiques humains.* 1 vol., 294 p., 93 fig., 4 pl. en couleurs, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1960. Prix : 38 NF.

L'analyse immuno-électrophorétique, décrite en 1953 par Grabar et Williams, s'est révélée une méthode extrêmement précieuse d'étude des mélanges de substances antigéniques, par le fait qu'elle associe les avantages de l'électrophorèse de zone et de l'analyse immunochimique. Elle permet donc de caractériser les constituants d'un mélange à la fois par leur mobilité électrophorétique et leur spécificité immunochimique. On peut y ajouter une troisième possibilité d'identification, grâce à des réactions colorées ou enzymatiques aisées à faire en gélose. Tous ces examens peuvent être effectués sur un liquide biologique, même peu abondant, et sans aucun traitement préalable. Les milieux biologiques humains ont tout particulièrement donné lieu, ces dernières années, à de nombreuses publications. Les auteurs ont jugé utile de rassembler ces travaux pour les présenter au lecteur sous une forme claire et dans un ordre méthodique, et nous sommes heureux de pouvoir bénéficier de leur expérience à ce sujet.

J.-C. L.

G. Payling Wright. — *An introduction to pathology.* 3^e édit. 1 vol., 617 p., Longmans Green and C^o, édit., Londres, 1958. Prix : 45 s.

La complexité et le langage quelque peu hermétique de l'anatomie pathologique en rendent, surtout pendant les premiers mois, l'initiation difficile et même ingrate. La lecture des volumineux traités, illustrés de très nombreuses images, risque souvent de conduire le lecteur vers des détails histo-pathologiques ou vers des maladies exceptionnelles, sans lui donner les synthèses lui permettant d'organiser ses connaissances.

Le volume de G. Payling Wright répond à cette nécessité et sa troisième édition apporte à nouveau des synthèses claires, volontairement sélectionnées, des diverses maladies métaboliques, des diverses infec-

tions et processus inflammatoires ou tumoraux, qu'ils soient bénins ou malins.

Destiné avant tout aux étudiants au début de leur entraînement clinique, c'est en outre une mise au point des acquisitions récentes, dont la lecture sera utile aux cliniciens, aux spécialistes avertis et, bien entendu, aux microbiologistes. J.-C. L.

Progrès de l'exploration de la tuberculose. Vol. X. Fortschritte der Tuberkuloseforschung. Advances in tuberculosis research. Rédacteurs : H. BIRKHAUSER, Bâle ; H. BLOCH, New-York, et G. CANETTI, Paris. S. Karger, édit., Bâle et New-York, 1960, VIII + 255 p., 30 fig. Prix : Fr. s. 48 (Bibliotheca Tuberculosea, fasc. 15).

Comme les volumes précédents de la même collection, le tome X apporte une série de très précieuses contributions originales à des problèmes actuels. Les titres des chapitres suffisent à en montrer l'intérêt : The evolution of the cooperative studies in the chemotherapy of tuberculosis of the Veterans Administration and Armed Forces of the U. S. A. — An account of the evolving education of the physician in clinical pharmacology (William B. TUCKER). — L'activité antituberculeuse de l'éthioniamide α -éthyl thio-isonicotinamide ou 1314 Th). Etude expérimentale et clinique (Noël RIST). — Die experimentellen Grundlagen einer Chemoprophylaxe der Tuberkulose mit Isonicotinsäure-hydrazid (INH) [K. BARTMANN]. — Die Prophylaxe und die Behandlung der postoperativen Bronchusfistel (A. P. NAEF). — Bronchial fistula and pleural empyema following pulmonary resection : non-specific infection as an etiologic factor (Jens L. HANSEN). — The morbidity from pulmonary tuberculosis in patients suffering from extrapulmonary tuberculous disease, Lupus vulgaris cutis (Knud CLASEN et Ole HORWITZ). N. R.

R. Debré. — *Calendrier des vaccinations.* 1 vol., 344 p., avec figures et tableaux (16 x 24), Masson et C^{ie}, édit., Paris 1960. Prix : 24 NF.

Ce volume contient le compte rendu d'un séminaire organisé au Centre International de l'Enfance, auquel ont participé des microbiologistes et pédiatres de divers pays. Les principaux chapitres en sont : le transfert de l'immunité de la mère à l'enfant, les associations vaccinales, les vaccins vivants et tués antipoliomyélitiques, les calendriers des vaccinations déjà utilisés dans divers pays et les propositions faites à ce sujet en fonction des conditions locales. L. L.

E. Lederer. — *Chromatographie en chimie organique et biologique.* Vol. II : *Applications en chimie biologique.* 1 vol., 876 p., Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1960.

Comme le premier volume (Généralités et Applications en chimie organique) de cet intéressant ouvrage de la Collection des Monographies de Chimie organique, chaque chapitre a été rédigé, sous la direction du professeur E. LEDERER, par un spécialiste qualifié.

Dans ce second volume, on trouvera des monographies sur l'application de la chromatographie (sur colonne et sur papier) d'adsorption,

de partage, d'échange d'ions, de « relargage », à l'étude des *sucres* (R. DEDONDER), des *esters phosphoriques* (J. MONTREUIL), des *composés soufrés* (P. FROMAGEOT), des *stéroïdes* (R. NEHER), des *lipides* (J. A. ASSELINEAU), des *aminoacides, peptides, amines* (M. JUTISZ et R. MONNIER), des *protéines* (M. JUTISZ), des *dérivés des acides nucléiques* (P. BOU-LANGER et J. MONTREUIL), des *pigments non azotés* (E. LEDERER) et *azotés* (G. BISERTE), des *vitamines liposolubles* (E. LEDERER), des *vitamines* et *facteurs de croissance hydrosolubles* (R.-L. MUNIER).

Ces deux volumes mettent à la disposition du chercheur et du technicien, outre une abondante bibliographie, des descriptions détaillées de méthodes expérimentales éprouvées qui leur permettront d'effectuer aisément la plupart des chromatographies sans consulter les travaux originaux. Ces ouvrages sont appelés à rendre les plus grands services à ceux qui pensent utiliser la chromatographie au laboratoire de recherche fondamentale ou appliquée

R. L. M.

Polypeptides which affect smooth muscles and blood vessels. 1 vol., 332 p., Pergamon Press, Oxford, Londres, New-York, Paris, 1960. Prix : 50 s.

Ce livre est le compte rendu d'un Symposium tenu à Londres en 1959. Il apporte de nombreuses informations et fait le point de nos connaissances sur la nature chimique et l'individualité de divers polypeptides actifs sur les muscles lisses et les vaisseaux.

Il faut mettre à part l'ocytosine et les vasopressines (Lys⁸ vasopressine et arg⁸ vasopressine) dont la structure est maintenant bien connue et l'usage bien établi.

La structure des angiotensines (hypertensine-angiotonine) est aussi connue, mais leur rôle dans l'hypertension a été diversement apprécié par les participants du symposium.

Pour les autres polypeptides étudiés, la structure chimique est encore inconnue et leur individualité est discutée par certains.

Citons la substance P. de Euler et Gaddum, la bradykinine et les substances voisines (kallidine, kinine du venin de guêpe). La bradykinine serait d'après Elliot un octapeptide (1 Gly, 1 Ser, 2 Arg., 2 Pro, 2 Phe).

La dernière partie est consacrée à l'étude de l'anaphylatoxine, de la leucotaxine et de l'exudine, et aux globulines capables de modifier la perméabilité capillaire.

Il paraît très probable que le nombre des polypeptides connus pourvus d'activité pharmacologique spécifique augmentera considérablement avec les progrès des techniques d'isolement et de synthèse. Le compte rendu de ce Symposium correspond à notre avis simplement à l'ébauche d'un nouveau et très complexe chapitre de la biochimie.

M. R.

M. E. Florey. — *The clinical application of antibiotics.* Vol. IV. 1 vol., 303 p., Oxford University Press, Londres, 1960. Prix : 84 s.

Ce livre traite de l'activité *in vitro* et de l'activité clinique des derniers antibiotiques : groupe de l'érythromycine, antibiotiques anti-

staphylococciques récents, ainsi que ceux actifs sur les protozoaires, les trypanosomes, les champignons et les cellules néoplasiques. Ces chapitres tiennent compte des publications majeures sans être absolument complets au point de vue bibliographie.

La partie finale consacrée au choix de l'antibiotique s'appuie plus sur des données cliniques que sur des épreuves de laboratoire.

Y. C.

D. D. Reid. — *La méthode épidémiologique dans l'étude des troubles mentaux. Organisation mondiale de la Santé : Cahiers de santé publique*, 1960, n° 2, 87 p. Prix : 5 s., \$ 1,00 ou Fr. s. 3. Publié également en anglais (Dépositaire pour la France : Librairie Masson, Paris).

L'épidémiologie, branche des sciences médicales qui étudie les facteurs influant sur la fréquence d'apparition et sur la fréquence globale dans les états pathologiques ainsi que les effets de la maladie sur la collectivité plutôt que sur l'individu, s'occupait surtout autrefois des maladies infectieuses, mais son champ d'application ne cesse de s'étendre. L'auteur examine les méthodes épidémiologiques dans leurs applications aux maladies mentales afin d'en définir aussi bien les possibilités que les limites. Les exemples cités sont choisis simplement pour montrer les problèmes pratiques rencontrés le plus souvent dans la planification, la conduite et l'interprétation des enquêtes épidémiologiques sur les troubles mentaux.

L'auteur n'a pas cherché à rédiger un manuel d'épidémiologie psychiatrique, mais à exposer les principes généraux d'utilisation des méthodes épidémiologiques en psychiatrie.

J.-C. L.

E. N. Willmer. — *Cytology and evolution*. 1 vol., 430 p., Academic Press, New-York et Londres, 1960. Prix : \$ 10,00.

L'auteur, distingué histologiste de l'Université de Cambridge, présente dans cet ouvrage de 430 pages ses idées sur l'évolution de diverses « classes de cellules ». Il suit leur devenir dans diverses lignées et recherche les multiples facteurs qui ont permis, à des cellules libres, de se grouper en colonies chez les invertébrés et même chez les vertébrés. Il envisage la croissance des « méchanocytes, des épithéliocytes, des amœbocytes », des cellules nerveuses, puis leurs groupements en « familles cellulaires » et leur différenciation respective. Plusieurs chapitres sont consacrés à titre d'exemple aux évolutions cellulaires des systèmes excréteurs, géniteurs, surrénaux et enfin à la rétine des vertébrés.

Cet ouvrage, agréable à lire, renferme sous un humour constant des idées très originales et certainement très fécondes pour les physiologistes, biochimistes, embryologistes et endocrinologistes.

P. D.

Printed in France.

Le Gérant : G. MASSON.

Dépôt légal. — 1960. — 4^e trimestre. — Numéro d'ordre 3463. — Masson et C^{ie}, édit., Paris. Ancienne Imprimerie de la Cour d'Appel, 1, rue Cassette, Paris.